

UNIVERSITE DE GENEVE
Département de médecine
sociale et préventive

FACULTE DE MEDECINE
Prof. Olivier JEANNERET (directeur)
Prof. Ragnar RYLANDER (prof. invité)

REACTIONS CELLULAIRES DANS LES POUMONS APRES INHALATION DE BACTERIES A GRAM-NEGATIF ET D'ENDOTOXINES

THESE

présentée à la Faculté de médecine de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur en biologie médicale

par

Marie-Claire **SNELLA-GIORIA**

de

DOMBRESSON (Neuchâtel)

Thèse No 16

GENEVE
Editions Médecine et Hygiène
1979



Digitized by the Internet Archive
in 2026

UNIVERSITE DE GENEVE
Département de médecine
sociale et préventive

FACULTE DE MEDECINE
Prof. Olivier JEANNERET (directeur)
Prof. Ragnar RYLANDER (prof. invité)

REACTIONS CELLULAIRES DANS LES POUMONS APRES INHALATION DE BACTERIES A GRAM-NEGATIF ET D'ENDOTOXINES

THESE

présentée à la Faculté de médecine de l'Université de Genève
pour obtenir le grade de docteur en biologie médicale

par

Marie-Claire SNELLA-GIORIA

de

DOMBRESSON (Neuchâtel)

Thèse No 16

GENEVE
Editions Médecine et Hygiène
1979

La Faculté de médecine, sur le préavis des professeurs Olivier Jeanneret et Ragnar Rylander, autorise l'impression de la présente thèse, sans prétendre par là émettre d'opinion sur les propositions qui y sont énoncées.

Genève, le 10 septembre 1979

Le doyen :
André Cruchaud

Thèse No 16



Je tiens à exprimer ma gratitude au professeur Ragnar Rylander qui a dirigé cette thèse avec enthousiasme et persévérance. Son amitié et ses conseils m'ont été une aide très précieuse pour l'achèvement de ce travail.

Je remercie le professeur Olivier Jeanneret, directeur de l'Institut de médecine sociale et préventive, qui nous a accueilli dans son Institut, permettant ainsi la réalisation de ce travail.

Mes remerciements vont également à Isabelle Gourdon, laborantine, et Roland Kupsc, aide de laboratoire, pour leur aide technique compétente et efficace, et à Ariane Catry, secrétaire, qui a assuré la dactylographie du manuscrit et l'exécution des figures. A tous trois, merci pour leur amitié qui a rendu notre collaboration des plus agréables.

Je remercie les docteurs C. Ahmad-Zadeh et J. Bornand de la Division d'immunologie et de sérologie de l'Institut d'hygiène qui nous ont permis d'effectuer les dosages du complément dans leur laboratoire.

Special thanks go to Inger Mattsby, from the Institute of Medical Microbiology, Department of Immunology of the University of Gothenburg (Sweden) who made the *Elisa* determination of antibodies in rats sera and lavage fluids. My thanks go to Eva Johansson, Gunilla Arvidsson, Birgitta Folgemark for able assistance with the laboratory work during my stay at the Institute of Hygiene of the University of Gothenburg (director professor R. Rylander).

Ce travail a pu être effectué grâce au Fonds national pour la recherche scientifique (No 6.196-0-76) et au Conseil suédois de la recherche médicale.

A MES PARENTS

A J.

TABLE DES MATIERES

1. Introduction	p. 1
2. Les endotoxines et leurs effets	p. 5
2.1 Structure et chimie	p. 5
2.2 Activation du complément	p. 6
2.3 Effets métaboliques	p. 7
2.4 Pouvoir mitogène	p. 7
2.5 Modification de la susceptibilité à l'infec- tion	p. 7
2.6 Effet pyrogène	p. 8
2.7 Tolérance	p. 8
2.8 Effets vasculaires	p. 9
3. Effets provoqués par l'inhalation de bactéries à Gram-négatif ou d'endotoxines	p. 11
3.1 Etudes cliniques	p. 11
3.2 Etudes expérimentales	p. 15
4. Matériel et méthodes	p. 23
4.1 Animaux	p. 23
4.2 Chambres à exposition	p. 23
4.3 Aérosols	p. 24
4.3.1 Enterobacter aerogenes	p. 24
4.3.2 Lipopolysaccharides	p. 24
4.3.3 Zymosan	p. 25
4.4 Schéma d'exposition	p. 25
4.4.1 Expositions aiguës	p. 25
4.4.2 Expositions sub-chroniques	p. 25
4.5 Traitement des animaux	p. 27
4.5.1 Sacrifice	p. 27
4.5.2 Décomplémentation in vivo	p. 27
4.5.3 Immunisation	p. 27
4.6 Techniques biologiques	p. 28
4.6.1 Lavage des bronches et comptages des cellules libres	p. 28
4.6.2 Dosage des anticorps	p. 28
4.6.3 Dosage du complément	p. 29
4.6.4 Plaques d'hémolyse	p. 30
4.7 Traitement des données	p. 32

5. Résultats p.3

Cellules libres dans les voies aériennes

Tabl. 1 ... après exposition aiguë à <i>E.aerogenes</i>	p.3
Tabl. 2 ... a)b) après exposition aiguë à LPS <i>E.coli</i>	p.3
Tabl. 3 ... après exposition sub-chronique à <i>E.aerogenes</i> ...	p.3
Tabl. 4 ... après exposition sub-chronique à LPS <i>E.coli</i>	p.4
Tabl. 5 ... après exposition sub-chronique suivie d'un arrêt et d'une exposition supplémentaire à <i>E.aerogenes</i>	p.4
Tabl. 6 ... après exposition sub-chronique suivie d'un arrêt et d'une exposition supplémentaire à 10 ug LPS de <i>E.coli</i>	p.4
Tabl. 7 ... Répartition des différents types cellulaires ... chez les témoins	p.4
Tabl. 8 ... Répartition des différents types cellulaires ... chez les exposés	p.4
Tabl. 9 ... après décomplémentation	p.5
Tabl. 10 .. après exposition au zymosan	p.5

Exposition sub-chronique des rats

Tabl. 11 .. cellules libres	p.5
Tabl. 12 .. anticorps sériques	p.5
Tabl. 13 .. anticorps bronchiques	p.6
Tabl. 14 Effets sur la réponse immune locale	p.6
Fig. 1 Schéma d'exposition sub-chronique	p.7
Fig. 2 Cinétique de la réaction leucocytaire	p.7
Fig. 3 Cinétique des différents types cellulaires (exposi- tions aiguë et sub-chronique).....	p.7

6. Discussion p.6

6.1 Méthodes	p.6
6.1.1 Choix des animaux	p.6
6.1.2 Mode d'exposition	p.6
6.1.3 Concentration	p.6
6.1.4 Immunisation	p.6
6.1.5 Décomplémentation	p.6
6.1.6 Lavage des bronches - énumération des cellules libres.	p.6
6.1.7 Technique des plaques d'hémolyse	p.6
6.2 Résultats	p.6
6.2.1 Les cellules libres	p.6
6.2.2 Les macrophages	p.6
6.2.3 Les leucocytes	p.6
6.2.4 Invasion leucocytaire et complément	p.6
6.2.5 Production d'anticorps	p.6
6.2.6 Effets sur la réponse immune primaire du poumon	p.6

7. Conclusions	p. 88
8. Résumé	p. 90
Références	p. 91

*

*

*



1. INTRODUCTION

Les bactéries à Gram-négatif sont largement répandues dans l'environnement animal et végétal. Elles comprennent entre autre la vaste famille des Enterobacteriaceae qui sont les hôtes normaux ou pathologiques, suivant les espèces, du tube digestif de l'homme et des animaux. Les principaux genres de cette famille sont les Escherichia, Shighella, Salmonella, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Proteus. Ces souches n'ont besoin que d'un milieu relativement pauvre, composé d'eau et de sels minéraux pour se multiplier (11).

Les parois de ces bactéries sont composées d'une macromolécule de type lipopolysaccharidique, qu'on appelle endotoxine. Cette capsule est composée de trois couches, contenant des phospholipides, des protéines, des polysaccharides et des lipopolysaccharides.

Une contamination par les germes à Gram-négatif ou par les endotoxines a été signalée dans l'environnement général. Di Luzio et Jorgensen ont dosé jusqu'à 1250 µg/ml d'endotoxine dans de l'eau potable (26,55). On a trouvé des endotoxines dans les poussières de maison (47,81) et plusieurs auteurs ont décrit une contamination de systèmes de ventilation et d'air conditionné par les germes Gram-négatifs (123,124).

Dans le milieu professionnel, on a décrit une contamination en milieu hospitalier (64,72,117), dans les usines d'épuration des eaux usées (1,24,59,65,104,125) et dans les usines de textiles, notamment les usines de coton (19,66,74,79,99-103,105,108,109,113).

Les systèmes de ventilation et d'humidification de l'air de grands édifices tels que les bureaux ou des hôpitaux sont également une source de contamination de l'air ambiant. Les filtres et les systèmes d'humidification de ces appareils peuvent permettre une forte prolifération de germes, où les bactéries à Gram-négatif sont nombreuses. Le brassage de l'air provoqué par ces appareils facilite également la suspension des particules dans l'air et par suite leur inhalation (123).

Les endotoxines peuvent être absorbées soit par voie digestive, soit par voie intraveineuse, soit par inhalation. Les bactéries à Gram-négatif étant les hôtes naturels de notre intestin, celui-ci possède un système de défense local (21). La pénétration d'endotoxine dans la circulation par voie digestive a été montrée dans certain cas d'insuffisance hépatique (39).

Une absorption par voie intraveineuse reste accidentelle. Elle peut survenir lors de l'injection d'une solution nutritive contaminée (36) ou d'une hémodialyse (31). Chez l'homme, dès 0,001 μ g de LPS / kg de poids corporel, on remarque l'apparition de fièvre. Les autres symptômes décrits sont un malaise généralisé, une hypotension généralisée, une activation du système du complément et de la coagulation intrinsèque, une leucopénie suivie d'une leucocytose.

L'absorption par voie pulmonaire est due à l'inhalation d'air contaminé, on a vu que la contamination peut être très importante et constituer un facteur de risque pour certains travailleurs. Une absorption accidentelle par voie aérienne peut survenir lors de l'utilisation à des fins thérapeutiques de nébuliseurs (92,115). Cette absorption est due à une mauvaise désinfection du matériel.

Les données concernant les usines d'épuration des eaux d'égoût, et les usines de coton, montrent des concentrations en bactéries Gram-négatives de 10^4 à 10^7 colonies par m^3 (104). Ces colonies, comptées sur plaques d'agar sont souvent le résultat d'une multiplication de plusieurs bactéries agglutinées. La concentration réelle en bactéries est donc supérieure à celle mesurée en aspirant simplement l'air au moyen d'un appareil d'Anderson. Le poids sec de 10^9 bactéries peut être estimé à environ 1 mg, 5 % de ce poids est composé par le LPS, le danger d'inhalation ces endotoxines est donc réel et quotidien pour les ouvriers exposés.

Même si l'inhalation représente la voie d'exposition la plus fréquente, les études faites sur les effets de l'inhalation de bactéries à Gram-négatif et d'endotoxines sont peu nombreuses. Elles portent sur des effets généraux (formule sanguine) ou pulmonaires (fonctions respiratoires, histologie). La description de plus en plus fréquente de symptômes pouvant être liés à l'inhalation d'endotoxines rend nécessaire une étude plus approfondie au niveau pulmonaire, afin de déterminer les effets immédiats d'une exposition possible, ainsi que les effets dus à une exposition à court terme sur les réactions de défense pulmonaire.

Ce travail a pour objet :

- d'étudier la cinétique de l'invasion des voies aériennes par les cellules libres après une inhalation aiguë et une inhalation sub-chronique, et après une inhalation aiguë précédée par une exposition sub-chronique ;
- de rechercher la production d'anticorps locaux et sériques après une inhalation sub-chronique ;
- de montrer l'influence d'une exposition sub-chronique aux endotoxines et à *Enterobacter* sur la capacité de réponse immune.

* * * *

La description du travail expérimental sera précédée d'une revue de la littérature, comprenant une brève description des effets provoqués par l'absorption d'endotoxine, d'un exposé sur les travaux traitant des effets dus à l'inhalation d'endotoxines et de Gram-négatifs et d'une description des cas cliniques où l'inhalation d'endotoxines a pu jouer un rôle prédominant.

2. LES ENDOTOXINES ET LEURS EFFETS

Il ne s'agit pas de faire ici une revue complète de l'abondante littérature concernant les endotoxines, mais de donner une liste des principaux effets dus à l'administration de LPS. Des revues plus complètes sont nombreuses, nous en citons quelques unes parmi les plus récentes.

2.1. *STRUCTURE ET CHIMIE*

Les lipopolysaccharides sont des macromolécules formant la paroi des bactéries Gram-négatives. La présence d'une molécule intacte confère à la cellule une stabilité, et la protège de l'action des antibiotiques, des poisons, et de la réaction de l'hôte lors d'une infection. Dans une revue récente, Galanos et coll (38) en donnent une description détaillée dont on peut retenir que la molécule est composée d'un hétéropolysaccharide : la chaîne O-spécifique qui est liée à un hétéropolysaccharide central : le noyau (core). Le noyau est lui-même attaché à un oligosaccharide de caractère lipidique : le lipide A. Bien que l'endotoxine ait été identifiée comme étant la surface de la cellule bactérienne, on sait que l'endotoxine libre peut être présente lors d'une infection, que l'on peut la trouver dans un filtrat de culture. L'endotoxine libre n'est donc pas libérée à la mort de la bactérie seulement, mais elle peut être présente lors de la croissance normale d'une culture bactérienne (91).

Les LPS montrent un spectre large d'activités toxiques. Plusieurs d'entre elles, telles que la réaction de Shwartzman locale ou généralisée, une diminution de la pression sanguine conduisant au choc, sont des manifestations physio-

pathologiques néfastes pour l'organisme. Les LPS ont également des activités comme le pouvoir adjuvant, l'induction d'une résistance non-spécifique à l'infection, la pyrogénicité qui peuvent être considérées comme bénéfiques. Beaucoup de ces propriétés peuvent être reproduites avec du lipide A libre (37-38).

2.2 ACTIVATION DU COMPLEMENT

Le LPS active le complément par la voie alternée essentiellement, en déclenchant les activités biologiques suivantes (37,40,41,68) :

- la production d'anaphylatoxine qui provoque la contraction du muscle lisse et augmente la perméabilité capillaire ;
- la libération d'histamine et d'héparine par les cellules mastocytaires ;
- l'adhérence et la dégranulation des plaquettes ;
- la coagulation sanguine intrinsèque ;
- la libération de facteurs chimiotactiques pour les polymorphonucléaires et les mononucléaires ;
- des modifications et des altérations des membranes cellulaires (67).

2.3 EFFETS METABOLIQUES

In vitro, le LPS stimule la glycolyse cellulaire, surtout celle des cellules inflammatoires comme les PMN du cobaye. In vivo, le LPS diminue la réserve en hydrates de carbone de l'animal, augmente le métabolisme basal. C'est un antagoniste de la cortisone, il inhibe la glycogénèse initiée par elle. L'action du LPS serait directe sur les enzymes essentiels de la gluconéogénèse. Cette augmentation de la glycolyse cellulaire est compatible avec une augmentation du pouvoir phagocytaire et une hyperplasie du système réticuloendothelial (8).

2.4 POUVOIR MITOGENE

Le LPS provoque une augmentation de la synthèse d'ADN par les cellules immunes B (dérivées de la moelle osseuse (4)). Les cellules B ainsi activées produisent des IgM contre divers antigènes. Ce pouvoir mitogène est attribué à la fraction lipide A de la molécule de LPS. Grâce à son pouvoir mitogène, le LPS peut se substituer aux cellules T et aux macrophages dans l'incitation d'une réponse immune. Le pouvoir mitogène du LPS est parallèle à son action adjuvante (9,71).

2.5 MODIFICATION DE LA SUSCEPTIBILITE A L'INFECTION

Dans les heures qui suivent l'injection d'endotoxine, on remarque une diminution passagère de la résistance à l'infection, puis une augmentation de la résistance durant environ une semaine. La diminution passagère est mise en relation avec une surcharge du SRE. L'augmentation de la

résistance qui suit est due à une multiplication des cellules phagocytaires parallèle à une augmentation de leur métabolisme (20).

Les endotoxines provoquent également une production d'interféron, ce qui confère à l'hôte une résistance aux infections virales (47).

2.6 EFFET PYROGENE

L'apparition de fièvre après administration d'endotoxine est provoquée par la libération d'un facteur pyrogène qui est sécrété par les granulocytes, les macrophages et les cellules de Küpfer (43). Ce facteur pyrogène (endogenous pyrogen) est une protéine à faible poids moléculaire. Les travaux de Feldberg (32) et Philipp-Dormston (82) indiquent que la prostaglandine E_2 et la C'AMP sont responsables des effets sur l'hypothalamus antérieur. D'après ces données Galanos (38) propose la séquence suivante dans l'apparition de fièvre après administration d'endotoxine: Le lipide A agit sur les cellules phagocytaires (granulocytes, cellules de Küpfer) qui vont sécréter le facteur endogène pyrogène. Ce dernier active la prostaglandine synthetase, déclenchant ainsi une production de prostaglandine PGE_2 , celle-ci va activer l'adenylate cyclase et la C'AMP permettant l'apparition de fièvre.

2.7 TOLERANCE

Par des injections répétées de faibles doses d'endotoxine, on peut rendre un hôte tolérant aux différents effets provoqués par une injection, comme la fièvre, ou

l'effet léthal. Cette tolérance est non spécifique, et le temps entre les deux injections et l'apparition de la tolérance n'est pas suffisant pour permettre l'apparition d'anticorps. Selon Greissman (43), cette tolérance serait due à une augmentation de la résistance des cellules phagocytaires, telles que les cellules de Küpfer et granulocytes, à la libération du facteur endogène pyrogène.

Il existe également une tolérance immunologique due à l'apparition d'anticorps. Elle est plus persistante, les anticorps sont des IgM et des IgG anti O-spécifiques et anti-noyau, agissant par leur propriété de liaison avec l'antigène (44).

2.8 EFFETS VASCULAIRES

L'injection d'endotoxine provoque la libération d'amines vasoactives endogènes telles que l'histamine, la sérotonine, etc... ces produits sont libérés soit dans la circulation, soit localement. Les effets physiologiques sont une hypotension artérielle générale et une augmentation de la résistance vasculaire pulmonaire (73). Le site de l'injection influence directement la réponse particulière d'un organe (49). Au niveau pulmonaire, l'hypertension observée est en partie due à un blocage mécanique par l'accumulation des plaquettes et des leucocytes, les vaisseaux pulmonaires, artères et veines, sont également sous l'influence des substances vasopressives relâchées par les éléments formés du sang (61,78).

Les différentes revues concernant ce sujet notent une grande variabilité des réponses selon l'espèce animale étudiée.

Les données concernant les endotoxines ont été obtenues en effectuant sur les animaux des injections intra-veineuses, intra-péritonéales ou locales sous-cutanées. Dans notre introduction, nous avons mentionné l'importance de la contamination de l'air par les bactéries Gram-négatives et leurs endotoxines. Cette contamination aérienne provoque l'inhalation de ces substances. Le poumon est alors une importante porte d'entrée, nous voulons dans le chapitre suivant décrire les quelques références qui traitent des effets provoqués par l'inhalation d'endotoxines.

3. EFFETS PROVOQUES PAR L'INHALATION DE BACTERIES A GRAM-NEGATIF OU D'ENDOTOXINES

3.1 ETUDES CLINIQUES

En 1942, Schneider et coll (108), Neal et coll (74), ont décrit un épisode aigu de maladie, rencontré chez des travailleurs fabriquant des matelats avec un coton de très mauvaise qualité. Cette maladie survenait entre une et six heures après le début du travail, la phase aiguë était brève et apparaissait généralement 24-48 heures après l'exposition. Les principaux symptômes décrits étaient une irritation de la conjonctive de l'oeil, une oppression, une sécheresse de la gorge, des douleurs généralisées, la fatigue, le mal de tête, la toux et les tremblements, la fièvre, l'anorexie, la nausée et les vomissements. Les auteurs ont attribué ces symptômes, analogues à ceux rencontrés dans le "Mill fever" des travailleurs du coton, à la présence de bactéries Gram-négatives. En effet, après avoir examiné les poussières de coton de différentes provenances, ils ont établi que toutes celles ayant provoqué un épisode de maladie, étaient fortement contaminées par les souches à Gram-négatif. Un effet dû aux moisissures trouvées dans ces poussières a été écarté, à cause du faible pouvoir pathogène de celles-ci. En faisant inhaler à des volontaires une suspension de bactéries isolées du coton, les auteurs ont pu reproduire les symptômes décrits chez les travailleurs. Les mêmes auteurs ont signalé en 1948 (109) un épisode aigu analogue chez des travailleurs de la canne à sucre et l'on attribué à une forte contamination de la bagasse par des bactéries à Gram-négatif.

En 1961, Pernis et coll (79) ont souligné le rôle important des endotoxines dans la pathogénèse des maladies professionnelles dues à l'inhalation de poussières végétales. Ces épisodes de maladies ont une symptomatologie uniforme, telle que fièvre, toux, dyspnée, maux de tête, malaise. Ces symptômes sont très proches des effets produits par l'inhalation expérimentale d'endotoxine. On ne remarque pas de modification radiologique et après un à deux jours, les symptômes disparaissent. Si l'exposition est quotidienne, les travailleurs ont des symptômes plus prononcés les jours de reprise de travail après un congé, comme après le week-end, ce qui explique le nom de " Monday fever " attribué à ces symptômes. Ces auteurs ont cité les données d'autres groupes concernant des symptômes analogues rencontrés chez des travailleurs du chanvre, du lin, chez des patients atteints du poumon du fermier, de la fièvre des imprimeurs, de la maladie due aux humidificateurs. En ce qui concerne la byssinose (maladie des travailleurs du coton) elle ne présente pas d'épisode aigu, elle apparaît après plusieurs années d'exposition, débutant par des signes de " Monday fever ". Puis on remarque chez les patients l'établissement de difficultés respiratoires chroniques, les patients n'ont pas de fièvre, la radiographie pulmonaire ne montre aucune altération. Pernis et coll. ont signalé également le cas d'une firme pharmaceutique de Milan qui fabriquait des vaccins anti-typhoïde. Lors de la centrifugation des *Salmonella typhi* tuées, une forte quantité de bactéries s'échappait dans l'air exposant ainsi les ouvriers. Pendant ces épisodes, environ chaque 3 mois, certains travailleurs avaient une température élevée (39°), tous montraient des affections bronchiques.

En 1968, Mentessesana et coll (66) ont décrit un épisode aigu de " symptômes du lundi " dans une usine de coton, en Sicile. 37 % des travailleurs ont été touchés. Ces effets ont été attribués à la contamination bactérienne du coton utilisé, la principale souche étant un Gram-négatif nommé *Brevibacterium* par les auteurs.

En 1976, Kholer et coll (60) ont signalé deux cas de toux, fièvre et dyspnée, dus à des bactéries thermotolerantes en forme de bâtonnets ressemblant à *B. Sereus*, à Gram-négatif et positif. Ces souches ont été retrouvées dans les humidificateurs utilisés par les patientes. Dans les deux cas, les symptômes ont disparu avec la cessation de l'utilisation de ces humidificateurs.

Rylander et coll (104) ont décrit une exposition de travailleurs dans une usine d'épuration des eaux d'égout qui utilisait un système de séchage des boues. Les ouvriers ont montré des symptômes oculaires (écoulement leucocytaire) et de la fièvre accompagnée de frissons. 50 % des ouvriers de l'usine étaient touchés. Des analyses ont montré une augmentation du nombre de leucocytes et de thrombocytes, du taux d'immunoglobulines sériques et de C-réactive protéine. On a également signalé la présence de produits de dégradation du fibrinogène dans l'urine. Les tests respiratoires n'ont pas été effectués. Bien qu'ils n'aient pu établir une relation causale évidente, les auteurs ont attribué ces symptômes aux endotoxines qui contaminaient fortement l'air de cette usine.

Friend et coll (35) ont décrit des symptômes d'oppression, de frissons, de dyspnée, de toux, de fièvre, chez les ouvriers d'une papeterie. En analysant l'environnement de ces travailleurs les auteurs ont trouvé à 25°C 100.000

germes Gram-négatifs par millilitre dans l'eau alimentant le système de refroidissement des machines. Les concentrations en moisissures étaient 1.000 fois inférieures. Les auteurs n'ont pas attribué les symptômes à l'un des contaminants plus qu'à un autre. Ils ont signalé la présence de précipitines dans le serum. La périodicité des symptômes dépendant du moment depuis lequel le patient est exposé et non de la concentration des contaminants. Ils ont comparé cette périodicité à celle décrite dans la byssinose.

Parmi le personnel d'un bureau (7 personnes) Rylander et coll (107) ont décrit 3 cas montrant des épisodes de fièvre, accompagnés de symptômes respiratoires en fin de journée. Le lendemain, les symptômes ont disparu, mais la formule sanguine signale une leucopénie. Le personnel de ce bureau faisait usage d'un humidificateur. Une analyse de l'eau alimentant cet humidificateur a mis en évidence des germes Gram-négatifs. Pendant la marche de l'appareil, le nombre de Flavobactéries dans l'air était de 3.000 colonies/m³. Cette contamination n'était pas présente lorsque l'appareil ne fonctionnait pas. Les auteurs ont pensé que ces épisodes peuvent être attribués à la présence des endotoxines des souches Gram-négatives.

On voit que la présence d'endotoxines dans l'air environnant et l'apparition de symptômes respiratoires et de malaise général chez des personnes exposées peuvent être mis en relation dans de nombreux cas. Les endotoxines ne sont pas toujours le seul agent responsable, plusieurs types de moisissures ont été incriminés (*Micropolyspora faeni*, *Fusarium trichoderma*, etc.) et certains protozoaires (amibes, flagellés ciliés tels que *Naegleria gruberi*, *Acanthamoeba polyphaga*, *A. castellanii*, *A. astronyxis*) (29). Mais la mise en évi-

dence de l'un de ces contaminants n'exclut pas la présence de germes Gram-négatifs et d'endotoxines.

On trouve dans la littérature plusieurs articles décrivant des symptômes tels que : fièvre, dyspnée, frissons, malaise, etc... Dans certains cas, les auteurs ont déterminé la source mais pas l'agent causal lui-même. Il s'agit généralement d'exposition à l'air d'humidificateurs (77,83,116,127) ou lors d'un bain chaud (5) ou d'une sauna (69).

3.2 ETUDES EXPERIMENTALES

Les premiers essais expérimentaux d'inhalation de bactéries Gram-négatives ou d'endotoxines ont été faits en 1942 par Neal, Schneider et Caminata (74) à propos de leur étude sur l'étiologie de la maladie aiguë des travailleurs du coton. Ces auteurs ont fait inhaler à différentes espèces animales telles que des chats, hamsters, cobayes, singes, lapins, poulets, le surnageant d'une culture de " Bactérium du coton ". Ils n'ont montré aucune réaction chez ces animaux. Ils ont également exposé des volontaires chez qui ils ont pu mettre en évidence une irritation des muqueuses (nez, gorge, oeil) des nausées, une augmentation de la température. Le filtrat de la culture utilisée provoquait une réaction de Schwartzman positive chez le lapin supposant une présence d'endotoxine.

En 1961, Pernis et coll(79) ont décrit chez des lapins une dyspnée et une apparition de fièvre après inhalation d'endotoxine. Les animaux avaient inhalé un aérosol, généré à partir d'une solution contenant 15 µg/ml de LPS de S.Abortus equi, pendant 15 minutes (4 ml de la solution

avaient été vaporisés). L'augmentation de la température rectale était de 1 à 1.5 °C. La dyspnée, mesurée à l'aide d'un tracé spirométrique était souvent clairement évidente, ces deux phénomènes étaient généralement observés entre 30 et 50 minutes après inhalation. Les deux manifestations étaient de plus en plus fréquentes à la seconde inhalation. Si les animaux étaient exposés deux jours consécutifs, la seconde exposition était sans effet par rapport à la première. Les auteurs ont attribué celà à l'établissement d'une tolérance aux endotoxines.

Dans cette même étude, les auteurs rapportent des essais faits sur eux-mêmes. Trois d'entre eux ont inhalé environ 3 ml d'une suspension contenant respectivement 5, 10 et 20 µg/ml d'endotoxine de *S. Abortus equi*. Les effets immédiats ont été une toux sèche, une dyspnée et une légère diminution de la capacité vitale. Quatre jours plus tard, ils ont à nouveau inhalé 20 µg/ml d'endotoxine, ils ont trouvé chez deux d'entre eux les mêmes symptômes que précédemment avec en plus l'apparition de fièvre et de malaise. Le 3ème a eu une forte réaction d'hypersensibilité dès le début de l'inhalation avec une forte fièvre et un erythème généralisé, l'expérience a immédiatement été arrêtée.

En 1966, Snell (111) a exposé des lapins à un aérosol d'endotoxine. L'exposition durait 15 minutes, la quantité de solution vaporisée était de 10 ml. Il a utilisé des suspensions contenant 0.5, 1.0, et 3.0 mg d'endotoxine par ml. Dans ces conditions d'expérience, il n'a pas estimé la quantité de LPS absorbée par chaque animal. Des animaux témoins ont inhalé de l'eau stérile pendant 15 minutes.

Snell a montré chez les animaux exposés :

- une diminution du nombre de leucocytes sanguins déjà 10 minutes après la fin de l'exposition et persistant quelques heures ;

- l'apparition d'un état fébrile, après une période de latence de 1 à 2 heures suivant l'exposition. La température atteignant un maximum après 4 à 7 heures. La période de latence était réduite si la concentration en LPS de l'aérosol était plus forte.

Des expositions quotidiennes pendant 7 jours consécutifs a résulté une diminution significative de la fièvre après l'exposition.

Au 5e jour après une exposition aiguë, Snell a démontré l'apparition d'anticorps hémagglutinants. Les titres atteignant un maximum entre le 7e et le 14e jours. 24 heures après l'exposition au LPS, Snell a décrit une histologie pulmonaire, montrant une hémorragie capillaire, un oedème massif des parois alvéolaires et une infiltration des parois alvéolaires par de grosses cellules phagocytaires, des éosinophiles et des polymorphonucléaires. Par endroit, l'oedème et l'infiltration cellulaire obstruaient l'espace alvéolaire. a signalé une légère inflammation des bronches et des bronchioles sans la décrire. Le deuxième jour après l'exposition, l'oedème septal était moins sévère et le changement le plus frappant était une prolifération des macrophages alvéolaires. Après 4 jours, l'oedème avait disparu et les parois alvéolaires montraient de faibles infiltrations par des mononucléaires et des éosinophiles. De plus, les alvéoles contenaient beaucoup de macrophages et une infiltration lymphocytaire s'était développée autour des petits vaisseaux et des broncholes terminales.

Toutes ces modifications avaient disparu à la fin des deux semaines ne laissant aucune fibrose résiduelle. L'auteur a défini ces manifestations histologiques comme une pneumonie interstitielle aiguë. Il a conclu que l'inhalation d'endotoxine n'altèrait aucune des propriétés toxique et antigénique de la molécule. La rapidité avec laquelle la

leucopénie s'est installée lui a suggéré que l'absorption est immédiate au niveau du poumon. L'apparition plus tardive de la fièvre et sa persistance après la fin de l'inhalation a montré que l'absorption est plus lente qu'après une injection. En effet, l'auteur a remarqué cette augmentation de température, 1 à 2 heures après l'inhalation, avec un maximum de 4 à 7 heures après, alors qu'après une injection iv, ces temps sont respectivement de 90 à 120 minutes et 3 à 4 heures. Une augmentation de la concentration de LPS dans la suspension vaporisée diminuait la période de latence, mais la fièvre a atteint son maximum plus lentement et persiste plus longtemps. De ce point de vue, l'auteur a comparé ce mode d'administration à une injection sous cutanée ou intra-musculaire.

En 1969, Cavagna et coll (18) ont publié les résultats d'une exposition chronique. Des lapins ont inhalé 8 heures par jour du lundi au vendredi, pendant 20 semaines un aérosol de LPS de E.Coli contenant 20 µg/ 2 ml NaCl. Ils ont été examinés chaque lundi pour les paramètres suivants :

- numération du nombre de globules blancs, augmentation de la température : les auteurs ne signalent aucune modification ;
- analyse du fluide bronchique : Cavagna et coll montrent une augmentation de la teneur en protéines, mais aucune variation entre les différentes classes d'immunoglobulines (IgA, IgG et IgM) par rapport aux témoins.

Après 4 semaines d'exposition, les auteurs ont montré l'apparition d'anticorps sériques avec la technique d'hémagglutination. Les tests de fonctions pulmonaires n'ont mis en évidence aucun changement chez les animaux exposés par rapport aux témoins. En augmentant la concentration de l'aérosol à 100 µg/ml, les auteurs ont provoqué une augmenta-

tion de la résistance et une diminution de la compliance pulmonaire. L'inhalation d'endotoxine pendant 5 mois a développé chez tous les lapins examinés une image histologique décrite par les auteurs comme une exfoliation des cellules bronchiales, une sécrétion endobronchiale et une infiltration lymphocytaire péribronchique. Tous les animaux avaient un épaississement du septa alvéolaire.

Rylander et coll (98-103) ont étudié l'invasion des bronches par les cellules libres après inhalation de poussières organiques, notamment des poussières de coton. Les animaux ont été exposés à un aérosol, préparé à partir des poussières, ils ont inhalé cet aérosol pendant 40 minutes, puis ils ont été sacrifiés à différents temps après l'exposition. Les auteurs ont décrit une réaction maximum après 24 heures, caractérisée par une forte augmentation du nombre de leucocytes. La réaction dépend de la dose inhalée. La toxicité d'une poussière organique est en relation directe avec sa contamination en bactéries Gram-négatives, mais il n'est pas nécessaire que les bactéries soient vivantes, puisqu'un traitement à 80°C ou à 100°C augmente la toxicité de la suspension. Les auteurs concluent que l'afflux de leucocytes est dû à l'action des endotoxines. Ces résultats ont été confirmés et complétés par d'autres expériences où les auteurs ont montré avec les mêmes techniques une corrélation entre la réaction leucocytaire, suscitée par différentes poussières de coton et leur contenu en germes à Gram-négatif. De plus, au moyen du test au Limulus et de la réaction de Swartzman, ils ont montré une relation entre la réaction pulmonaire observée et le contenu en endotoxines de la poussière inhalée. Les auteurs proposent un modèle pouvant expliquer les réactions aiguës après inhalation de coton, connues sous le nom de " Mill fever ".

En 1977, Hudson et coll (52) ont publié une étude faite avec des cobayes et des hamsters. Les animaux ont inhalé l'endotoxine de *Salmonella typhosa* pendant 2 ou 4 heures, l'aérosol contenait 0.1 mg de LPS par ml. Les auteurs ont examiné dans un groupe d'animaux les granulocytes sanguins et ceux récoltés par lavage des bronches. Dans le second groupe, ils ont examiné l'histologie des poumons, après fixation au tetroxyde d'osmium dans le fluorocarbène, qui retient les cellules à la surface des voies aériennes. Le nombre de polymorphonucléaires sanguins a significativement augmenté dans le sang cardiaque alors que les lymphocytes ont diminué. Les cellules obtenues par lavage des bronches sont essentiellement des leucocytes polymorphonucléaires. Les maxima sont atteints 4 heures après exposition chez le cobaye et 6 heures chez le hamster.

L'examen histologique et morphométrique montrait une augmentation du rapport PMN/cell. épithéliales. De 2 à 3 % chez un animal témoin exposé à l'air ou à un aérosol d'eau, il passait à 21 puis 53 % chez le cobaye et à 50 % chez le hamster, tous ces animaux ayant été exposés 2 heures au LPS. Les polymorphonucléaires étaient localisés le long de la membrane basale, entre les cellules épithéliales et recouvraient la surface des voies aériennes.

La migration des leucocytes polymorphonucléaires des capillaires en direction de la lumière des voies aériennes est précédée par une margination des granulocytes dans les capillaires, les PMN semblent se coller à la paroi. Ceci suggèrent aux auteurs qu'ils se déplacent depuis les capillaires à travers la lamina propria vers l'épithélium et ensuite vers la lumière des voies aériennes. Les espaces alvéolaires sont normaux mais on remarque après 6 heures un léger

épaississement intersticiel accompagné d'un léger oedème. De plus, on remarque que les plaquettes adhèrent à la paroi de l'artériole adjacente à la bronche ou bronchiole. L'examen de l'ultrastructure des granulocytes et des plaquettes montraient des cellules normales.

En 1977, Pierce et coll (84) ont, au moyen de techniques histologiques, quantifié l'infiltration des bronches et des alvéoles par des leucocytes PMN. Des souris avaient reçu des bactéries par inhalation 2 et 4 heures après ; les animaux ayant inhalé des souches à Gram-négatif avaient un nombre de PMN significativement plus élevé que les témoins. Pour ces auteurs, les leucocytes PMN ont un rôle primordial dans la défense locale contre certaines souches bactériennes.

Les études cliniques révèlent que la présence d'endotoxines dans l'air peut constituer un danger pour les personnes exposées à cause de la présence d'autres micro-organismes qui ne permet pas toujours de désigner clairement l'agent étiologique des symptômes généralisés et pulmonaires décrits. Il est indispensable de soutenir les études sur les effets des endotoxines par des données expérimentales.

Les études expérimentales faites sur l'homme ont été faites pour montrer que les endotoxines inhalées provoquent les mêmes symptômes que ceux ressentis par les travailleurs des usines de coton (74, 79). Elles ne permettent pas d'expliquer les mécanismes responsables. De plus, ce type d'expérimentation n'est pas sans danger (79) et pose un problème d'éthique.

L'expérimentation animale a permis d'obtenir des renseignements histologiques (18, 77, 111) en plus de la confirmation des effets physiopathologiques tels que l'apparition de fièvre (79, 111), les modifications des fonctions respiratoires (79) et de la formule sanguine (18, 111).

Les études plus récentes (52,98-103) soulignent plus précisément les phénomènes cellulaires provoqués par une exposition aiguë. Le travail de Hudson (52) permet de localiser la migration des leucocytes. Il ne donne pas de mesure quantitative satisfaisante de la réaction.

La méthode que nous avons utilisée (98-103) nous a permis de montrer une relation dose-réponse 24 heures après une inhalation aiguë. Nous voulons continuer ces investigations par une étude de la cinétique de la réaction leucocytaire après une exposition aiguë et pour différentes concentrations, par des données sur les mécanismes responsables de cette réaction. Il nous paraît aussi important d'étudier la réaction leucocytaire après plusieurs jours d'exposition ainsi que l'effet d'un arrêt d'exposition, et de déterminer l'influence d'une exposition sur la réponse immune locale.

4. MATERIEL ET METHODES

4.1 ANIMAUX

Nous avons utilisé des cobayes mâles et femelles adultes, dont le poids variait entre 250 et 300 gr. au début des expériences. Ces animaux provenaient de l'Institut Vétérinaire de l'Université de Zurich. Dans notre animalerie, les cobayes étaient trois par cage. Ces cages étaient placées dans un suspensoir qui assure un système de ventilation, filtrant l'air parvenant dans chaque cage et le rejetant à l'extérieur sans contaminer les autres cages (95). Les animaux ont reçu de l'eau à volonté et de la nourriture en granulés, spécialement conçue pour cobayes (Würfel n. 840, Nagag AG, Gossau).

Pour certaines expériences, nous avons utilisé des rats albinos adultes, mâles, dont le poids variait entre 350 et 400 grammes. Ils ont été maintenus dans les mêmes conditions que les cobayes. Ils ont été nourris avec des granulés et de l'eau à volonté.

4.2 CHAMBRES A EXPOSITION

Pour les expositions, les animaux sont placés par groupe de 5 dans des chambres en aluminium d'un volume de 37 litres. Le débit d'air à travers la chambre est maintenu à raison de 4 m^3 l'heure. L'air servant de diluant est filtré avant de parvenir à la chambre.

4.3 AEROSOLS

Les suspensions sont vaporisées à partir d'un aérosol de type Collison qui alimente directement la chambre où sont placés les animaux. L'aérosol généré par ce système contient plus de 95 % de particules dont le diamètre est inférieur à $1\text{ }\mu\text{m}$ (93).

4.3.1 *Enterobacter aerogenes*

Les bactéries ont été mises en culture sur des plaques d'Endo agar (pour bâtonnets Gram-négatifs), incubées 24 heures à 37°C . A l'aide d'un petit râteau stérile, la culture a été recueillie puis suspendue dans de l'eau distillée stérile afin d'obtenir une suspension contenant 10^8 bactéries/ml. La concentration a été vérifiée à l'aide d'un compteur Petroff-Hausser.

La suspension est ensuite placée dans le flacon alimentant la chambre à exposition. Dans les conditions décrites ci-dessus, la concentration de bactéries dans l'air est de 3.10^5 bact/1 (3.10^8 bact/ m^3).

La quantité d'air inhalée par un cobaye pendant une minute est 0.16 l/min, on estime dans nos conditions que chaque animal absorbe environ $1,9.10^6$ bactéries pendant 40 minutes.

4.3.2 *Lipopolysaccharides*

La suspension de LPS a été préparée avec une endotoxine de E.Coli 026-B6 (Lab.Difco). La solution placée dans le flacon alimentant la chambre à exposition contenait 10 ou 100 $\mu\text{g/ml}$. La concentration dans la chambre étant

respectivement de 0.03 µg/l et 0.3 µg/l. La quantité inhalée par chaque animal pendant 40 minutes pouvant être estimée alors à 0.19 µg et 1.9 µg.

4.3.3 Zymosan

La suspension est préparée avec du Zymosan de *Saccaromyces cerevisiae* (Biosynth. AG., Zurich) dilué dans de l'eau distillée stérile. Cette suspension est passée aux ultra-sons afin de l'homogénéiser.

Les différentes concentrations utilisées étant 10 µg, 100 µg, 1 mg et 10 mg.

4.4 SCHEMA D'EXPOSITION

4.4.1 Expositions aiguës

Les expositions aiguës durent 40 minutes. Les animaux sont placés par groupes de 5 dans la chambre à exposition. Les examens biologiques sont effectués à divers temps après la fin de cette exposition. Ce temps est indiqué dans le tableau des résultats pour chaque expérience.

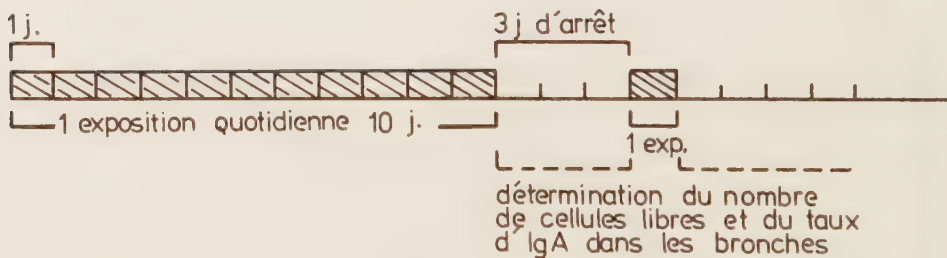
4.4.2 Expositions sub-chroniques

Les cobayes sont exposés pendant 10 jours quotidiennement, chaque exposition dure 40 minutes. Les examens biologiques sont effectués à divers temps après la dernière de ces 10 expositions. Certains groupes de cobayes après une exposition sub-chronique et 3 jours sans exposition, ont subi une nouvelle exposition de 40 minutes. Le schéma de cette

exposition est décrit dans la figure 1. Dans ce cas, les animaux ont été examinés à divers temps après cette exposition supplémentaire. Les rats ont été exposés selon le schéma de la figure 1. Dans ce cas, les animaux ont été examinés après la première exposition sub-chronique, puis après l'exposition supplémentaire. Les différents temps sont indiqués dans le tableau des résultats.

fig. 1

SCHEMA D' EXPOSITION



4.5 TRAITEMENT DES ANIMAUX

A chaque nouvel arrivage d'animaux, nous avons effectué un contrôle de l'état infectieux de leurs poumons au moyen d'une technique de lavage des bronches puis détermination du nombre de cellules libres (96).

4.5.1 Sacrifice

Les animaux ont été tués par une injection intrapéritonéale de 3 ml de penthotal de sodium à 5 % (Lab. Abbott no. 3321).

4.5.2 Décomplémentation *in vivo*

Nous avons décomplémenté les cobayes selon la technique décrite par Maillard et Zarco (63). Les animaux ont reçu une injection intra-péritonéale de facteur de venin de Cobra (CVF no. 750.005 Cordis Laboratory, Miami, Florida). La dose était de 20 unités par 100 gr. de poids corporel. Cette injection a été faite 24 heures avant l'exposition des animaux.

4.5.3 Immunisation

Les cobayes ont reçu une injection intra-trachéale de globules rouges de mouton (Veterinaria AG, Zurich). La quantité injectée était 2×10^9 cellules dans 0.25 ml de NaCl isotonique stérile.

4.6 TECHNIQUES BIOLOGIQUES

4.6.1 Lavage des bronches et comptages des cellules libres

Nous avons appliqué la méthode décrite par Rylander (94). Il s'agit d'injecter dans la trachée de l'animal tué 10 ml de sérum physiologique au moyen d'une seringue. Ce liquide est recueilli dans un tube à essais, une partie est colorée avec une solution de Türk (bleu de méthylène 2 % : 5 gouttes, d'acide acétique glacial : 2,5 ml, eau distillée : 500 ml).

On dénombre les cellules libres au moyen d'une chambre hématocrite de Bürker. Le nombre de cellules ainsi compté est rapporté à la quantité totale de liquide injecté dans les poumons, et le résultat exprime le nombre total de cellules libres dans les voies aériennes $\times 10^6$.

Une partie des cellules obtenues a été utilisée pour faire un frottis au moyen d'une cytocentrifuge (Shandon SCA-0030). Le frottis a été coloré par des solutions May-Grünwald/Giemsa et la répartition donne les pourcentages de macrophages et monocytes, de neutrophiles, éosinophiles, basophiles et lymphocytes.

4.6.2 Dosage des anticorps

Pour chaque animal, le liquide de lavage a été centrifugé pour éliminer les cellules. Le surnageant a été recueilli puis congelé jusqu'au moment du dosage, ainsi que le serum. Les déterminations des taux d'IgG, IgA et IgM anti-LPS de E.Coli 026-B6 ont été effectuées au moyen de la technique ELISA (Enzyme - linked immunosorbent assay) (2,30). Le principe de cette technique est basé sur une réaction entre

l'anticorps et l'antigène qui est fixé sur une base solide. En ajoutant une anti-immunoglobuline spécifique, conjuguée à un enzyme (ici la phosphatase alcaline) les anticorps qui ont réagi avec l'antigène deviennent détectables. Ceci est obtenu en ajoutant le substrat de l'enzyme, le p-nitrophenyl phosphate-NPP. Le phosphate lié est ensuite hydrolysé et le p-nitrophenolate, qui possède une couleur jaune, est libéré. L'intensité de cette couleur est proportionnelle à la quantité d'anticorps de l'échantillon et est mesurée avec un spectrophotomètre à 405 mμ de longueur d'onde.

Les sera et lavages bronchiques ont été dilués de 10 en 10 en commençant par une dilution 1/100 pour le serum et 1/10 pour le lavage. Un serum de référence a été inclu dans chaque série. La dilution donnant une valeur d'extinction de 0.15 pour ces IgG, de 0.125 pour les IgA et les IgM a été considérée comme le titre ELISA du serum ou du lavage à tester. Ces dosages ont été effectués par Inger Mattsby, de l'Institut d'Immunologie de l'Université de Göteborg.

4.6.3 Dosage du complément

Les sera et liquides de lavage à doser ont été congelés à - 70°C jusqu'au moment du dosage. Nous avons utilisé la méthode de titration hémolytique du complément CH 50 (56).

4.6.4 Plaques d'hémolyse

Nous avons employé la méthode de Cunningham (22). Les chambres d'incubation sont confectionnées avec une lame de verre dégraissée pour histologie sur laquelle on a appliqué avec du scotch double face des lamelles. Les chambres ainsi obtenues contiennent une seule couche de cellules et facilitent le comptage des plaques d'hémolyse. Le test a été effectué 7 jours après l'injection intra-trachéale.

Le poumon entier a été disséqué, puis réduit en petits morceaux au moyen de ciseaux, on a suspendu ces morceaux dans une solution de Hank's à froid (Difco Lab.), puis on a extrait les cellules au moyen d'une pipette pasteur dont l'extrémité a été coupée, afin d'aspirer également les morceaux de grande taille. On a filtré ensuite cette suspension à travers du coton hydrophile mis dans une seringue de 10 ml. La suspension de cellules dépourvue de morceaux tissulaires fut ensuite centrifugée, à froid, pendant 10 minutes à 2000 rpm. Le culot de cellules a été ensuite resuspendu dans du Hank's, on effectue un comptage au moyen d'une chambre de Bürker en ne comptant que les lymphocytes. Pour l'incubation, nous avons utilisé 3 concentrations, la première était de $1,5 \text{ à } 3 \times 10^6$ lymphocytes par ml, cette solution a été diluée deux fois successives 1/2. Il est difficile d'obtenir une concentration de lymphocytes supérieure à celle indiquée ci-dessus.

Dans chaque chambre, on a incubé un mélange de :

- 100 μ l de suspension de lymphocytes
- 100 μ l de complément de cobaye dilué 1/4 dans le Hank's, (Bio-Mérieux, no. 7-2121)
- 20 μ l d'une suspension de globules rouges de mouton contenant 3×10^9 cell/ml.

Les chambres ont été incubées pendant 1 heure à 37° degrés C, dans une atmosphère saturée d'humidité.

Après le temps d'incubation, nous avons compté le nombre de plaques d'hémolyse au moyen d'une loupe. Le nombre de plaques ainsi compté est rapporté à un nombre de plaques par million de lymphocytes selon la formule :

$$\frac{\text{nombre de PFC/chambre}}{\text{concentration cell} \times 0.05} = \text{PFC}/10^6 \text{ lymphocytes}$$

4.7 TRAITEMENT DES DONNEES

La comparaison des différents échantillons de résultats a été effectuée au moyen du test de Student pour la différence entre deux moyennes. En désignant par n_1, n_2 les tailles respectives des échantillons à comparer, par m_1, m_2 leur moyenne et par s_1, s_2 leurs écarts types, ce test revient à calculer la statistique

$$t = \frac{m_2 - m_1}{s \sqrt{1/n_1 + 1/n_2}} \quad , \quad \text{avec} \quad s = \sqrt{\frac{(n_1-1)s_1^2 + (n_2-1)s_2^2}{n_1 + n_2 - 2}}$$

et à la comparer à la valeur déduite de la distribution théorique correspondant à un risque de première espèce donné.

L'hypothèse que les deux échantillons proviennent d'une population de même moyenne est refusée si la probabilité p d'observer la valeur de la statistique calculée est inférieure à un seuil de signification choisi.

Nous avons retenu les seuils de significations définis par $p \leq 0.01^{**}$ et $p \leq 0.05^*$.

5. RESULTATS

tableau 1

Nombre de macrophages et leucocytes ($\times 10^6$) dans les voies aériennes de cobayes. Les comptages ont été effectués à différents temps après une exposition aiguë à *Enterobacter aerogenes*

Temps (heures)	Effectif	Macrophages	Leucocytes
Témoins	10	5.7(3.9)	5.4(3.1)
24	10	7.1(6.2)	**25.4(14.2)
48	10	6.7(2.7)	**18.6(11.3)
72	10	10.4(6.7)	**16.5(9.5)
96	10	6.8(2.6)	** 9.2(1.4)

Le tableau 1 montre l'évolution de l'invasion des bronches par des cellules libres après inhalation d'une suspension d'Enterobacter. Les macrophages et les leucocytes libres ont été énumérés à différents temps après l'exposition. On remarque une augmentation du nombre de macrophages qui atteint un maximum après 72 heures. Cependant, cette augmentation n'est pas significative. En ce qui concerne les leucocytes, leur nombre est significativement augmenté après 24 heures, puis on observe une diminution, mais le nombre de leucocytes à chaque temps après l'exposition est toujours significativement différent par rapport à la valeur des témoins ($p \leq 0.01$), la diminution qui a lieu entre 72 et 96 heures est significative à $p \leq 0.05$.

tableau 2 a)

Nombre de macrophages et leucocytes ($\times 10^6$) dans les voies aériennes de cobayes. Les comptages ont été effectués à différents temps après une exposition aiguë au LPS E.Coli O26-B6 (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)

Temps (heures)	Effectif	Macrophages	Leucocytes
Témoins	10	4.2(2.3)	4.2(3.0)
3	10	3.3(1.4)	**36.0(22.7)
5	9	6.0(3.9)	**40.0(17.0)
12	9	5.6(2.3)	**41.2(18.9)
24	8	**9.8(4.5)	**76.8(22.5)
48	9	**7.8(5.9)	**42.8(26.7)
72	9	**10.2(4.3)	**24.3(5.9)
96	10	**9.9(3.3)	**18.5(8.8)

tableau 2 b)

Exposition aiguë 10 μg LPS

Temps (heures)	Effectif	Macrophages	Leucocytes
Témoins	5	2.8(1.6)	2.6(1.6)
24	4	4.7(0.9)	**32.0(6.3)
48	5	**7.2(1.5)	**29.3(9.8)

Le tableau 2 a) montre le même phénomène après une exposition aiguë au LPS de E.Coli 026-B6 (100µg/ml). Nous avons dans le cas de cette exposition, examiné les animaux dans les premières heures qui suivent l'inhalation. On remarque, 3 heures après l'inhalation, une légère dépression du nombre de macrophages qui n'est cependant pas significative; puis le nombre augmente pour atteindre un maximum 72 heures après l'exposition. L'augmentation observée est significative déjà 24 heures après l'exposition ($p \leq 0.01$). 96 heures après, l'augmentation observée est toujours significativement supérieure à la valeur témoin ($p \leq 0.01$).

L'augmentation du nombre de leucocytes est très marquée. Déjà 3 heures après l'inhalation, le nombre trouvé est 10 fois supérieur à celui des témoins. Le maximum de la réaction est atteint après 24 heures comme pour l'exposition à Enterobacter, 4 jours après l'exposition, le nombre de leucocytes dans les bronches est encore significativement différent de celui des animaux témoins ($p \leq 0.01$).

Le tableau 2 b) donne les résultats après une exposition aiguë à 10 µg/ml. L'augmentation du nombre de macrophages est significative après 48 heures ($p \leq 0.01$). Les leucocytes ont montré une très forte augmentation à 24 heures et 48 heures ($p \leq 0.01$).

figure 2

Cette figure souligne le parallélisme entre la réaction leucocytaire après une exposition aiguë à *Enterobacter aerogenes*, au LPS *E.Coli* O26-B26, 100 µg/ml et 10 µg/ml. Dans les 3 cas, le nombre maximum de leucocytes est atteint après 24 heures, après 48 heures, ce nombre est encore significativement élevé par rapport aux témoins. Ce tableau souligne la relation dose réponse de la réaction leucocytaire. La concentration la plus forte provoquant une réaction plus rapide, plus élevée et durant plus longtemps.

Une estimation théorique (48) nous indique que la concentration de 10^8 bactéries par ml correspond à 10 µg de LPS (voir discussion p. 64).

Ces estimations sont confirmées par ces résultats.

fig. 2

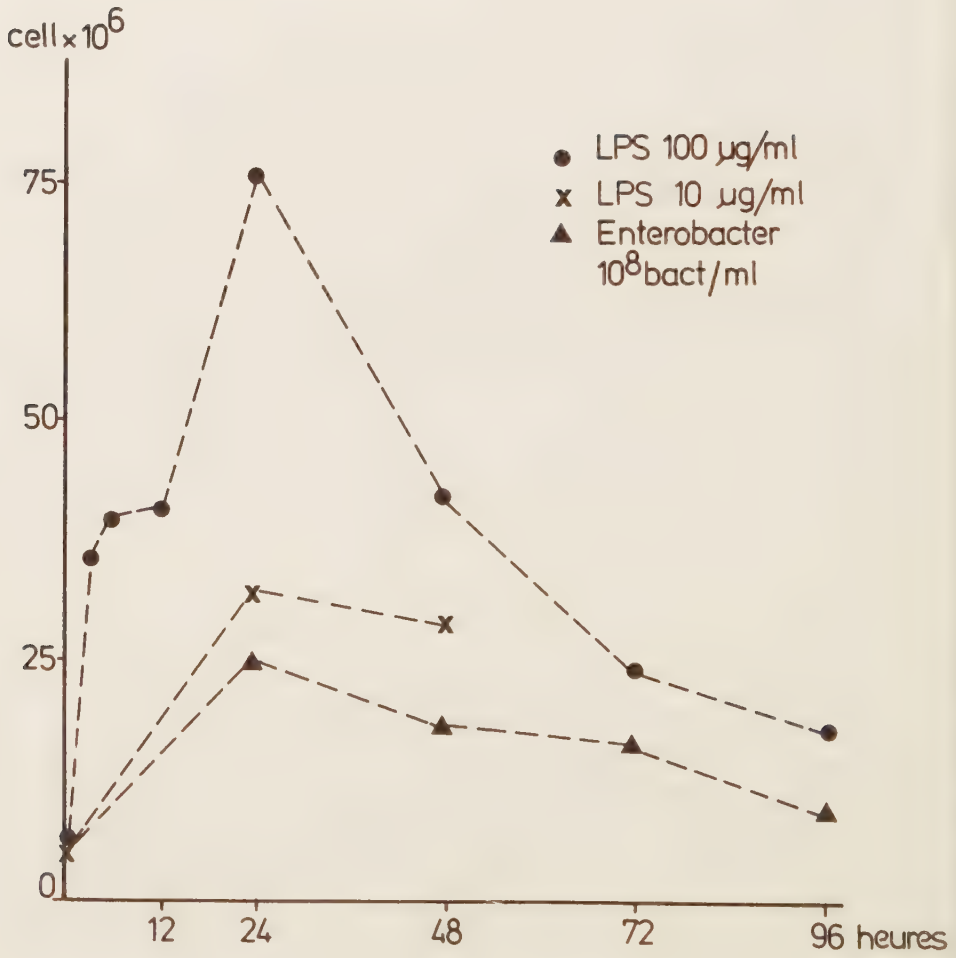


tableau 3

Nombre de macrophages et leucocytes ($\times 10^6$) dans les poumons de cobayes exposés 10 jours consécutifs à *Enterobacter aerogenes*. Les comptages ont été effectués à différents temps après la dernière exposition

Temps (heures)	Effectif	Macrophages	Leucocytes
Témoins	7	3.1(1.1)	4.0(1.3)
0	10	**11.2(4.8)	**25.7(9.1)
24	9	**13.4(6.9)	**28.8(17.0)
48	10	**13.6(6.4)	**23.0(9.5)
72	10	**14.2(6.6)	**12.0(4.5)

Le tableau 3 donne l'évolution de la réaction cellulaire dans les bronches après une exposition sub-chronique de 10 jours consécutifs à *Enterobacter aerogenes*. Les comptages des cellules ont été effectués à différents temps après la dernière exposition.

Chez ces animaux, le nombre de macrophages est significativement élevé dès la fin de l'exposition ($p \leq 0.01$), ce nombre reste au même niveau jusqu'à 72 heures après l'exposition.

Au temps 0, le nombre de leucocytes est également très élevé ($p \leq 0.01$), ce nombre se maintient au même niveau encore 48 heures après. A 72 heures, le nombre de leucocytes diminue par rapport à la valeur précédente (48 heures) ($p \leq 0.05$) mais reste cependant significativement différent de la valeur des animaux témoins ($p \leq 0.01$).

tableau 4

Nombre de macrophages et leucocytes ($\times 10^6$) dans les poumons de cobayes exposés 10 jours consécutifs au LPS, (100 $\mu\text{g/ml}$). Les comptages ont été effectués à différents temps après la dernière exposition

Temps (heures)	Effectif	Macrophages	Leucocytes
Témoins	15	4.1(2.7)	3.7(2.9)
1	8	**13.1(8.7)	**63.7(37.8)
5-6	10	**20.4(9.6)	**72.9(23.0)
12	7	**10.9(2.3)	**49.9(7.4)
24	8	**21.2(9.7)	**53.2(23.0)
48	5	** 9.3(4.4)	**24.7(7.0)
72	5	**11.3(5.8)	**15.6(4.5)

Le tableau 4 donne les résultats après une exposition sub-chronique de 10 jours consécutifs au LPS E.Coli 026-B6 (100 $\mu\text{g/ml}$). Les comptages ont été effectués à différents temps après la dernière exposition.

Le nombre de macrophages est élevé à la fin de la dernière exposition ($p \leq 0.01$). Cette valeur subit des fluctuations significatives entre 5-6 et 12 heures, entre 12 et 24 heures, et entre 24 et 48 heures. 72 heures après la dernière exposition, le nombre de macrophages est encore significativement élevé par rapport à la valeur des animaux témoins.

Chez ces animaux, le nombre de leucocytes est très élevé dès la première heure après la fin de la dernière exposition, cette valeur se maintient au même niveau jusqu'à 24 heures après ($p \leq 0.01$) puis entre 24 et 48 heures on voit une diminution significative qui se poursuit encore entre 48 et 72 heures ($p \leq 0.05$), cependant les valeurs sont encore significativement supérieures à celles des animaux témoins ($p \leq 0.01$).

tableau 5

Nombre de macrophages et de leucocytes ($\times 10^6$) dans les poumons de cobayes exposés 10 jours à *Enterobacter aerogenes*, et après 3 jours d'interruption, une fois supplémentaire. Les comptages ont été effectués à différents temps après cette dernière exposition

Temps (heures)	Effectif	Macrophages	Leucocytes
Témoins	10	5.7(3.9)	5.9(3.0)
0	10	*10.6(4.3)	**20.0(9.2)
24	10	**13.3(6.1)	**31.4(10.2)
48	10	**14.2(4.6)	**33.2(10.8)
72	10	* 9.6(5.0)	*12.4(7.2)
96	10	6.5(3.2)	9.1(4.2)

Le tableau 5 donne les résultats de l'évolution de la réponse cellulaire après une exposition sub-chronique de 10 jours, suivie par 3 jours d'arrêt, puis d'une exposition supplémentaire. Les lavages des bronches ont été effectués à divers temps après cette dernière exposition. L'aérosol contenait une suspension d'*Enterobacter aerogenes*.

Le nombre de macrophages est significativement plus élevé à la fin de l'exposition ($p \leq 0.05$), il augmente et atteint son maximum à 24 et 48 heures ($p \leq 0.01$), la diminution entre 48 et 72 heures est significative ($p \leq 0.05$) après 96 heures, la valeur a rejoint celle des animaux témoins.

Le nombre de leucocytes suit le même schéma d'évolution, à la fin de la dernière exposition, il est déjà significativement supérieur ($p \leq 0.01$), il augmente pour atteindre sa valeur maximale à 24 et 48 heures ($p \leq 0.01$), il diminue rapidement entre 48 et 72 heures, ($p \leq 0.05$) après 96 heures la valeur rejoint celle des animaux témoins.

tableau 6

Nombre de macrophages et de leucocytes ($\times 10^6$) dans les poumons de cobayes exposés 10 jours au LPS (10 $\mu\text{g/ml}$) et après 3 jours d'interruption, une fois supplémentaire. Les comptages ont été effectués à différents temps après cette dernière exposition

Temps (heures)	Effectif	Macrophages	Leucocytes
Témoins	9	6.0(2.2)	2.9(1.1)
0	5	**12.3(4.4)	** 9.9(1.0)
4	5	**14.2(2.5)	**12.1(3.7)
12	5	**15.0(2.7)	**18.9(8.5)
24	5	**21.8(7.4)	**15.7(6.3)
48	5	**12.3(2.5)	**23.4(7.7)
72	5	8.1(2.8)	** 9.2(3.8)

Le tableau 6 donne les résultats après inhalation sub-chronique de LPS (10 $\mu\text{g/ml}$) décrite dans le schéma 1. Le nombre de macrophages chez les animaux exposés est significativement élevé par rapport aux témoins dès la fin de l'exposition supplémentaire ($p \leq 0.01$), il augmente pour atteindre sa valeur maximale à 24 heures, puis entre 24 et 48 heures on remarque une diminution (non significative) qui s'accroît entre 48 et 72 heures ($p \leq 0.05$), la valeur comptée à 72 heures n'est plus significativement différente de la valeur des témoins.

Le nombre de leucocytes est significativement élevé dès la fin de l'exposition supplémentaire ($p \leq 0.01$), il augmente lentement. La valeur maximum est atteinte vers 12 heures après et se maintient jusqu'à 48 heures (les fluctuations observées ne sont pas significativement différentes). Entre 48 et 72 heures, le nombre de leucocytes diminue significativement ($p \leq 0.05$), mais la valeur de 72 heures est encore significativement élevée par rapport à la valeur des animaux témoins ($p \leq 0.01$).

tableau 7

Répartition des différents types cellulaires dans le liquide de lavage des bronches d'animaux témoins. En pourcent.

	Effectif	Macrophages	Lymphocytes	Neutrophiles	Eosinophiles
obayes	15	71.1(8.5)	6.3(3.9)	6.4 (4.0)	16.2 (10.0)
obayes selon orenberg)	10	68.6(10.8)	11.7(5.1)	0.6 (1.9)	19.0 (6.0)
ats	9	86.2	13.3	0.79	0.04

Le *tableau 7* donne la répartition des différents types de cellules contenues dans le liquide de lavage bronchique des animaux témoins (cobayes et rats).

Nous avons indiqué les données de Gorenberg pour comparaison. On voit que les macrophages constituent plus des 2/3 de cette population.

Les cobayes et les rats ont une faible proportion de neutrophiles, par contre les cobayes ont un pourcentage relativement élevé d'éosinophiles. Cette forte proportion n'est pas retrouvée chez le rat.

tableau 8

Répartition des différents types cellulaires trouvés dans le liquide bronchique chez des cobayes témoins et des cobayes exposés au LPS E.Coli 026-B6. Les comptages ont été effectués après 24 heures.
Nombre de cellules x 10^6 , 5 animaux pour chaque groupe.

	Témoins	1 j.	10 j.	10 j.(72h.)	10j+72h+1j.
Total	10.8(5.4)	46.2(23.3)	55.7(18.5)	24.6(3.8)	48.9(13.6)
Macrophages	7.9(2.8)	*25.3(8.5)	*25.2(3.8)	*16.4(3.2)	*23.8(4.8)
Lymphocytes	0.6(0.5)	* 2.2(1.3)	* 2.5(1.2)	* 2.3(0.7)	* 2.4(0.6)
Neutrophiles	0.8(1.1)	*15.1(12.4)	*21.2(11.0)	1.6(0.4)	*17.5(8.3)
Eosinophiles	1.5(1.1)	3.6(2.5)	* 6.9(4.4)	* 4.5(2.3)	* 5.2(2.9)

La répartition des différents types cellulaires après exposition au LPS est résumée dans le tableau 8, et la figure 3. Les comptages ont été effectués après 24 heures, sauf ceux de la 4ème colonne, effectués après 72 heures. L'augmentation des différents types cellulaires est illustrée par la figure 3.

Le nombre de *macrophages* subit une forte augmentation après une exposition aiguë, ce nombre semble constant pendant les 10 jours d'exposition, 3 jours après l'exposition sub-chronique, le nombre de macrophages diminue significativement ($p \leq 0.01$). Une nouvelle exposition provoque une augmentation d'amplitude semblable.

L'inhalation provoque dès la première exposition, une augmentation faible mais significative du nombre de *lymphocytes*. Cependant, on n'observe aucune fluctuation du nombre après la fin de l'exposition sub-chronique et à la reprise d'une exposition aiguë.

Les *neutrophiles* augmentent spectaculairement dès la première exposition, ils augmentent encore au cours de l'exposition sub-chronique, cette augmentation est cependant pas significative. Trois jours après la fin de l'exposition de 10 jours leur nombre a rejoint la valeur des témoins. Une nouvelle exposition provoque à nouveau une augmentation d'amplitude semblable à la première.

Après un jour, les *eosinophiles* n'ont pas augmenté de façon significative, au 10ème jour d'exposition, l'augmentation est significative ($p \leq 0.05$). Les fluctuations à 72 heures et après la nouvelle exposition ne sont pas significativement différentes.

fig. 3

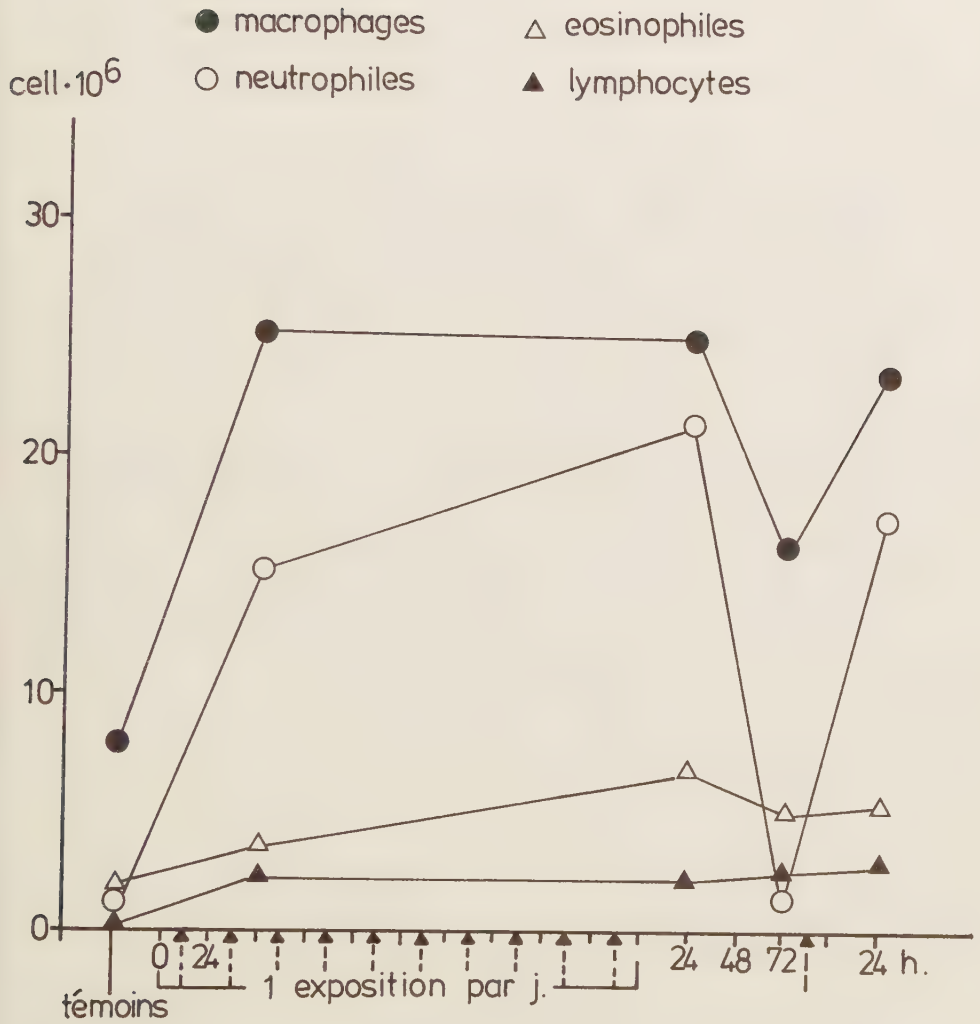


tableau 9

Nombre de macrophages et de leucocytes ($\times 10^6$) chez des cobayes décomplémentés. Les animaux ont inhalé soit du LPS (100 $\mu\text{g/ml}$), soit un extrait de poussière de coton contaminée par des germes Gram-négatifs. Les comptages ont été effectués après 24 heures

Traitement	Normaux		Décomplémentés	
	Macrophages	Leucocytes	Macrophages	Leucocytes
Témoins	3.5(1.9)	8.4(5.4)	*1.8(0.7)	* 3.3(0.7)
LPS 100 μg	6.0(1.6)	89.8(38.4)	*1.1(2.6)	76.2(5.2)
Coton	5.4(2.7)	87.3(31.8)	6.3(3.2)	73.4(38.1)

Des expositions aiguës ont été effectuées chez des animaux décomplémentés. Dans ce cas, les aérosols contenaient du LPS de E.Coli (100 μ g/ml) ou un extrait de poussière de coton fortement contaminée par des germes Gram-négatifs. Ces résultats sont reportés dans le tableau 9.

L'énumération des macrophages et des leucocytes a été effectuée 24 heures après l'exposition.

Chez ces animaux, nous avons vérifié le taux de C'sérique par la méthode des CH50. Tous les animaux normaux ont montré un pourcentage d'hémolyse moyen de 99,2 (3.6) pour la dilution 1/75 (CH50 285). Les animaux ont pour la même concentration une moyenne d'hémolyse de 7,7 (3.5) %, (CH 50 inférieure à 50). Deux animaux ayant subi une injection de venin de cobra n'ont montré aucune diminution du taux de complément hémolytique. Ils n'ont pas été pris en considération pour les moyennes ci-dessus, ils ont également été exclus pour les moyennes des cellules libres.

Par cette même méthode de CH50, nous n'avons pas mis en évidence de C'hémolytique dans les liquides de lavage des bronches de chacun des animaux de cette expérience.

Les nombres de macrophages et de leucocytes sont inférieurs chez les animaux témoins décomplémentés par rapport aux animaux normaux, ces différences sont significatives ($p \leq 0.05$).

Les animaux décomplémentés exposés au LPS ont un nombre de macrophages significativement inférieur à celui des témoins exposés ($p \leq 0.05$). Les animaux exposés au coton fortement contaminé ne montrent pas la même différence.

Chez les animaux exposés, on remarque que les animaux décomplémentés ont un nombre de leucocytes légèrement inférieur à celui des animaux normaux exposés au même aérosol, cette différence n'est pas significative.

tableau 10

Nombre de macrophages et de leucocytes ($\times 10^6$) après exposition à différentes concentrations de zymosan. Une série d'animaux a subi une injection intratrachéale. Les comptages ont été effectués après 24 heures

Traitement	Effectif	Macrophages	Leucocytes
Témoins	5	2.8(1.2)	3.5(2.3)
LPS 100 μ g	5	3.5(2.0)	**70.5(38.8)
Zymosan 10 μ g/ml	5	5.2(1.7)	2.1(0.9)
" 100 μ g/ml	5	*7.4(1.8)	4.2(2.4)
" 1 mg/ml	5	*7.6(4.4)	5.5(3.0)
" 10 mg/ml	5	*7.1(1.9)	3.8(1.6)
" 10 mg/ml	5	*7.4(3.0)	6.7(5.0)
injection I.T.			

Le tableau 10 montre les résultats des comptages de cellules libres chez des animaux ayant subi l'inhalation d'une solution de zymosan, un groupe a été exposé au LPS pour comparaison et un groupe a subi une injection intra-trachéale de zymosan. Les comptages ont été effectués 24 heures après l'exposition.

Le nombre de macrophages trouvé chez les animaux ayant inhalé ou subi une injection de zymosan est significativement supérieur à celui des animaux témoins ($p \leq 0.01$) et également au groupe LPS pour les groupes suivants : 100 μ g, 10 mg et 10 mg injecté ($p \leq 0.05$).

En ce qui concerne le nombre de leucocytes, les résultats ne montrent aucune différence significative entre les animaux témoins et les animaux exposés au zymosan .

tableau 11

Nombre de macrophages et de leucocytes ($\times 10^6$) chez les rats exposés 10 jours, plus un jour supplémentaire après 3 jours sans exposition. Les comptages ont été effectués dès la fin de la série de 10 expositions et après l'exposition supplémentaire

Temps (heures)	Effectif	Macrophages	Leucocytes
Témoins	12	1.4(0.6)	0.4(0.3)
0	10	*0.7(0.3)	1.0(0.9)
24	10	1.5(1.0)	*1.3(0.5)
48	10	1.2(0.6)	0.8(0.6)
72	10	1.5(0.6)	0.5(0.2)
<i>exposition supplémentaire</i>			
4	10	1.4(0.9)	0.6(0.5)
12	10	0.9(0.4)	0.8(0.7)
24	10	1.4(0.7)	0.8(0.7)

Le tableau 11 donne le nombre de cellules libres dans les bronches de rats ayant subi une exposition sub-chronique de 10 jours, suivie de 3 jours d'arrêt puis d'une exposition supplémentaire. Les rats ont inhalé une suspension de LPS contenant 10 $\mu\text{g/ml}$.

Les comptages ont été effectués à différents temps après l'exposition sub-chronique et après l'exposition supplémentaire. On voit que le nombre de macrophages à la fin de la 10ème exposition est inférieur à celui des animaux témoins (≤ 0.05). Dans les 3 jours qui suivent cette dernière exposition, leur nombre ne diffère pas de la valeur témoin. Après une exposition supplémentaire, le nombre de macrophages diminue faiblement 12 heures après, cette différence n'est pas significative, après 24 heures le nombre de macrophages rejoint la valeur témoin.

Après 10 jours d'exposition, le nombre de leucocytes augmente dès la fin de la dernière inhalation (non significatif). 1 jour après, l'augmentation est alors nettement significative ($p \leq 0.01$). Puis le nombre diminue et rejoint le nombre trouvé chez ces témoins après 72 heures.

Une exposition supplémentaire provoque une augmentation du nombre de leucocytes à 12 et 24 heures après l'exposition, ces modifications ne sont pas significatives.

tableau 12

Titres d'anticorps sériques spécifiques chez les rats exposés au LPS 026-B6. La colonne A donne le nombre d'animaux ayant un titre positif. La colonne B, la moyenne pour chaque groupe.

Temps (heures)	Effectif	A			B		
		IgG	IgM	IgA	IgG	IgM	IgA
Témoins	12	2	0	0	2.9	-	-
0	10	6	5	1	2.6	2.3	2.8
24	10	6	6	4	2.9	2.3	2.4
48	10	5	5	3	2.4	2.2	2.2
72	10	6	5	3	2.5	2.3	2.4
<i>exposition supplémentaire</i>							
4	10	6	5	3	3.1	2.4	2.2
12	10	8	1	4	2.7	2.4	2.3
24	10	7	7	4	3.1	2.3	2.9

Le tableau 12 résume les titres des anticorps sériques anti LPS 026-B6 chez les rats. Les rats ont été prélevés au moment du sacrifice des animaux pour le lavage bronchique.

La colonne A indique le nombre d'animaux ayant montré un titre positif. La colonne B, la valeur moyenne de ce titre.

On remarque que deux animaux témoins sur 12 ont montré un titre sérique IgG - anti LPS 026-B6 positif. Aucun témoin n'avait d'anticorps IgM ou IgA. Au temps 0 six parmi ces 10 rats exposés 10 jours au LPS ont montré des IgG sériques anti-LPS. Cinq de ces animaux avaient des IgM et un des IgA sériques. A 24, 48 et 72 heures, le nombre d'animaux possédant des IgG et des IgM anti LPS 026-B6 spécifiques variait entre 5 et 6 selon le groupe. La proportion d'animaux montrant des IgA n'a pas dépassé 4 sur 10.

Des taux comparables ont été mesurés aux différents temps après les 10 jours d'exposition comme après l'exposition supplémentaire.

tableau 13

Titre d'anticorps dans le liquide bronchique des rats exposés au LPS.

La colonne A donne le nombre d'animaux ayant un titre positif. La colonne B, la moyenne pour chaque groupe.

Temps (heures)	Effectif	A			B		
		IgG	IgM	IgA	IgG	IgM	IgA
Témoins	12	0	0	1	-	-	-
0	10	2	1	9	1.2	-	1.7
24	10	4	0	9	1.4	-	2.0
48	10	2	1	9	1.1	-	1.8
72	10	1	0	8	1.1	-	1.7
<i>exposition supplémentaire</i>							
4	10	3	0	10	1.4	-	1.8
12	10	3	0	10	1.3	-	1.5
24	10	6	0	10	1.4	-	1.6

Les taux d'anticorps bronchiques sont consignés dans le *tableau 13* . La colonne A indique le nombre d'animaux ayant un titre positif, la colonne B la valeur de ce titre.

Le liquide bronchique des animaux témoins ne contenait pas d'anticorps détectables. Un animal seulement avait des IgA anti-LPS 026-B6.

Sur les 70 animaux exposés, seuls 5 n'avaient pas d'IgA spécifiques. Dans chaque groupe d'animaux exposés, une proportion montrait des IgG détectables, la plus forte proportion étant dans le groupe examiné 24 heures après l'exposition supplémentaire.

Les IgM bronchiques étaient présentes chez 2 animaux sur 70 seulement. Des taux comparables ont été trouvés aux différents temps après les 10 jours d'exposition comme après l'exposition supplémentaire.

tableau 14

Nombre de plaques d'hémolyse (PFC) chez des cobayes exposés
10 jours au LPS ou à Enterobacter, et 4 semaines au LPS

	Effectif	PFC/10 ⁶ lymphocytes pulmonaires
Témoins	8	82 (57)
Exposés LPS 10 j. (100 µg)	8	*35 (14)
Témoins	9	97 (74)
Exposés Enterobacter 10 j.	9	61 (56)
Témoins	6	27 (19)
Exposés LPS 4 semaines (10 µg)	9	46 (32)

Le tableau 14 indique le nombre de plaques d'hémolyse par 10^6 lymphocytes pulmonaires, chez des cobayes ayant inhalé pendant 10 jours 100 $\mu\text{g/ml}$ de LPS, ou une suspension d'Enterobacter. Et un groupe ayant inhalé pendant 4 semaines du LPS (10 $\mu\text{g/ml}$ de suspension).

On voit que les animaux exposés pendant 10 jours ont une diminution du nombre de cellules produisant une hémolyse des globules rouges qui est significative pour le LPS ($p \leq 0.05$). Chez les animaux exposés un mois, on a par contre une augmentation non significative du nombre de cellules produisant une hémolyse.

6. DISCUSSION

6.1 METHODES

6.1.1 Choix des animaux

Le choix du cobaye pour des expériences d'inhalation est justifié par la grande sensibilité de réaction de son système respiratoire. Il a fréquemment été utilisé pour des études sur l'asthme et les bronchospasmes, ainsi que sur les réactions après inhalation de particules (51). La composition de ses cellules pulmonaires ressemble fortement à celle de l'homme, notamment dans la répartition des différents types de cellules libres et les proportions de lymphocytes pulmonaires B et T (46). La très grande sensibilité de cet animal permet de déceler une réaction à de faibles doses inhalées. Cependant, cette sensibilité est également un désavantage, plusieurs animaux n'ayant pas supporté une exposition de quelques jours à un aérosol contenant 100 µg de LPS/ml. C'est pourquoi après une première série à 100 µg, nous avons toujours utilisé 10 µg/ml pour des expositions sub-chroniques et chroniques.

Pour la mise en évidence des anticorps bronchiques et sériques anti LPS O26-B6, nous avons utilisé le rat. En effet, au moment où ont été effectuées les expériences, on ne trouvait pas dans le commerce d'anti-séra contre les diverses immunoglobulines du cobaye, par contre les anti-séra contre les immunoglobulines du rat étaient faciles à se procurer.

6.1.2 Mode d'exposition

Nous avons choisi de faire inhaler l'endotoxine sous forme d'aérosol, plutôt que de l'injecter intra-

trachéalement. L'aérosol présente, en effet, l'avantage de refléter une situation réelle. Il permet une bonne dispersion au niveau du poumon, et permet d'atteindre les voies aériennes les plus profondes. On évite ainsi les inconvénients d'une injection intra-trachéale : application locale d'une forte quantité de substance, mauvaise dispersion dans les poumons, altération et falsification du système de défense normal et de nettoyage pulmonaire (15).

Ce type d'exposition ne permet pas de contrôler exactement la dose absorbée par chaque animal. La réaction observée reste en relation avec la quantité de substance contenue dans l'aérosol. La quantité absorbée est estimée à partir de la concentration du produit dans l'air inhalé et la capacité respiratoire du cobaye évaluée à 0,16 l/min.

6.1.3 Concentration

La concentration d'Enterobacter dans l'air de la chambre à exposition est estimée à $1.9 \cdot 10^8$ bact. par m^3 . Les mesures effectuées dans l'industrie du coton montrent que la concentration moyenne sur une journée se situe entre 10^4 - 10^7 colonies/ m^3 (105). Dans une usine de traitement des eaux d'égout, Rylander et coll (104) ont estimé la quantité de bactéries à 10^4 - 10^7 également, et l'air d'un bureau alimenté par un humidificateur montrait $3 \cdot 10^3$ colonies/ m^3 (107). Les colonies comptées sont souvent formées à partir d'un agrégat de bactéries. Il faut donc considérer souvent que le nombre réel de bactéries vivantes est supérieur de 10^2 à 10^4 .

La concentration que nous avons utilisée est donc 10 fois supérieure, elle provoque une réaction chez tous les animaux exposés. Nous avons montré précédemment qu'on provoque une réaction cellulaire chez les cobayes dès une concentration de 10^3 - 10^5 bactéries par ml de suspension (103).

En ce qui concerne la concentration en endotoxine, une communication de Hellander (48) nous a confirmé que 10 μg correspondent environ à 10^8 bactéries par ml. La figure 2 montre que les deux expositions aiguës provoquent un effet d'amplitude comparable. Nous avons utilisé la concentration de 100 μg pour les expériences aiguës, certains animaux n'ayant pas supporté une exposition sub-chronique à cette concentration. A 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de suspension, tous les animaux exposés ont une forte réponse cellulaire.

6.1.4 Immunisation

Une immunisation par les globules rouges de mouton est fréquemment utilisée, car ceux-ci ont un fort pouvoir immunogénique et il existe des tests très sensibles permettant de détecter les anticorps spécifiques et de les doser. L'injection intra-trachéale ne présente pas une situation physiologique mais peut permettre une estimation de la réponse pulmonaire.

Nous avons tenté d'immuniser les animaux en leur faisant inhaler un aérosol de globules rouges. Cette technique a posé plusieurs problèmes et nous avons dû y renoncer. En effet, pour obtenir la quantité de globules rouges nécessaire à une immunisation primaire, il faut une très forte concentration de globules rouges dans la suspension, de cette manière l'aérosolisation est difficile à obtenir. D'autre part, les animaux exposés à de tels aérosols ont montré une forte réaction et nous avons dû cesser l'inhalation. Outre le test sensible des plaques d'hémolyse qu'ils permettent d'utiliser, les globules rouges représentent un antigène particulière de dimension semblable à celle des particules atteignant les voies

aériennes. Leur élimination des voies aériennes doit être semblable à celui d'autres particules inhalées. C'est un antigène complexe qui peut être comparé aux bactéries ou aux virus et peut provoquer une réponse immune au moins du même type que celle induite par des agents infectieux naturels (57).

Nous avons choisi d'évaluer la capacité de réponse immune primaire au moyen de la technique des plaques d'hémolyse directe. Ce choix a été déterminé par les données de la littérature. La détermination de la réponse secondaire pose également plus de problèmes sur le plan expérimental. De plus, l'effet d'un polluant sur la réponse secondaire est moins évident que pour la réponse primaire (118-119).

Nous avons injecté une dose correspondant à 5×10^9 globules rouges par animal. Dans une étude des effets régulateurs de l'antigène administré localement sur la réponse primaire, Hunninghake et Fauci ont montré que les doses optimales qu'ils ont utilisées étaient entre 10^{10} et 2.10^{10} par cobaye en ce qui concerne la réponse pulmonaire seulement. Au-dessous de 10^8 cellules aucune réponse n'a été mise en évidence par ces auteurs, au-delà de 2.10^{10} la réponse splénique est la plus importante aux dépens d'une réponse locale pulmonaire ou par les ganglions hilaires (53).

6.1.5 Décomplémentation

Pour décomplémenter les cobayes in vivo, nous avons suivi la méthode donnée par les laboratoires Cordis, fournisseurs du venin de cobra. Cette méthode est basée sur les travaux de Maillard et Zarco (63). Ces auteurs ont montré qu'une injection intra-péritonéale de 20 unités de venin de cobra par 100 grammes de poids corporel provoque une décomplémentation de l'ordre de 80 % à 90 % déjà dans les premières

heures qui suivent l'injection. Cette décomplémentation atteint 99 % dans les 24 heures et dure 5 jours. Elle affecte surtout le taux de C_3 , les autres composants étant moins touchés. Maillard et Zarco donnent les valeurs qu'ils ont obtenues après 6 heures C' 1,4,2,7 : non modifiés, C'9: 50 %, C'8 : 60 %, C'5 : 80 %. La diminution de C total est parallèle à celle de C_3 (> 95 %). Par cette méthode, Maillard et Zarco ont montré chez les cobayes une réduction considérable de la composante hémorragique dans la réaction d'Arthus. Les dommages vasculaires ainsi que la diffusion des polymorphonucléaires sont également faibles.

Dans le cadre de cette expérience, nous avons injecté du venin de cobra 24 heures avant l'inhalation de LPS ou de coton fortement contaminé ; selon Maillard et Zarco, nous pouvons considérer que le taux de C_3 avait diminué de plus de 95 %. Les animaux ont été tués 24 heures après l'exposition, c'est-à-dire 48 heures après l'injection de venin de cobra, toujours selon les auteurs précédemment cités, le taux de C_3 à ce moment était encore très bas.

Nous avons testé la présence de C hémolytique dans les sera et les liquides bronchiques selon la méthode CH 50 (56). Cette méthode classique nous a permis de déterminer si dans nos conditions la décomplémentation des animaux avait été effective ou non. Cette méthode est relativement peu précise, tous les animaux normaux examinés ont montré un pourcentage moyen d'hémolyse de 99,2. Sur 15 animaux injectés, avec le venin de cobra, deux n'ont pas montré de diminution de leur taux de C, la moyenne des 13 autres animaux se situant à 7,7 % d'hémolyse pour la concentration 1/75 que nous avons choisie comme valeur indicative.

Les animaux n'ayant pas montré de diminution de leur taux de complément après injection de venin de cobra n'ont pas été pris en considération pour les résultats

des cellules libres discutés dans ce travail.

6.1.6 Lavage des bronches - énumération des cellules libres

Brain a souligné l'importance de définir pour chaque expérience les conditions et de les standardiser afin de permettre les comparaisons. En effet, l'augmentation soit du nombre de macrophages, soit du nombre de leucocytes est spécifique pour un polluant donné, les relations dose-réponse sont également spécifiques. Chaque série d'animaux exposés devra être comparée avec un groupe témoin de même provenance et ayant subi les mêmes conditions de vie, excepté l'inhalation du polluant (14).

Nous avons employé la technique de lavage décrite par Rylander (94) depuis, cette méthode standardisée a été utilisée pour estimer la toxicité de divers polluants tels que la fumée de tabac (97), la poussière de MnO_2 (7), les poussières organiques comme le foin, le coton, la jute (100,101,105,106), diverses souches bactériennes (102),

Cette méthode est fiable et donne des résultats reproductibles. Nous distinguons les macrophages des leucocytes polymorphonucléaires dans la chambre de Bürker, au moyen d'un microscope optique (grossissement 500 x). Nous trouvons également dans le liquide de lavage des lymphocytes et quelques cellules épithéliales, mais leur nombre n'est pas affecté par l'inhalation et n'est pas compris dans les résultats donnés.

La différenciation des cellules au moyen de la chambre de Bürker ne permet pas une dénomination précise des types de cellules. Cette méthode nous permet de distinguer

les gros macrophages vacuolisés, et les leucocytes de taille plus petite et à noyau plurilobé, cette dernière catégorie comprend donc les neutrophiles, les éosinophiles, les lymphocytes, les monocytes et les macrophages non matures. Cette imprécision est confirmée par nos résultats, en effet au moyen de la chambre de Bürker on ne montre qu'une augmentation faible du nombre de macrophages, alors qu'après coloration de frottis au May-Grünwald-Giemsa, on voit que les macrophages sont la population la plus nombreuse et qu'elle augmente fortement après une exposition.

6.1.7 Technique des plaques d'hémolyse

Nous avons utilisé la technique modifiée de Cunningham (22). Cette technique a été utilisée par plusieurs auteurs pour estimer l'influence d'un polluant sur la réponse immune. Zarkower a étudié l'influence d'un mélange carbone SO_2 (128) ; Snella et Rylander du CO (114) ; Graham des métaux (42) ; Thomas et Holt de la fumée de tabac (118-119).

Les modifications soulignées par ces auteurs sont soit une augmentation, soit une diminution de la réponse, ceci dépendant de la concentration du polluant ou de la longueur de la période d'exposition.

La grande variation des résultats entre les différents animaux est un facteur qui ne permet pas toujours de trancher entre les différentes réponses, ceci peut être dû à des difficultés techniques lors de l'injection de l'antigène par voie intra-trachéale. La réponse peut varier selon le lieu exact de l'injection, elle peut également être due à la simple variation biologique entre les différents animaux, variation qui n'est pas toujours expliquée.

On sait également que les conditions de conditionnement des animaux ont une influence sur la variabilité des résultats (62). Nous maintenons les animaux toujours dans les mêmes conditions et ils sont tous de même provenance et utilisés au même âge, on ne peut cependant exclure des modifications saisonnières (chauffage des locaux) etc... On sait aussi l'importance des caractères génétiques dans la réponse des animaux (121), l'utilisation de souche " inbred " aurait pu diminuer également l'amplitude de variation des résultats. Il faut souligner que la large variation que nous avons trouvée est équivalente à celle trouvée par les auteurs précédemment cités.

6.2 RESULTATS

6.2.1 Les cellules libres

La réaction la plus frappante après expositions aux germes Gram-négatifs et aux endotoxines est l'invasion des bronches par des cellules libres. Elle a été décrite pour divers contaminants de l'air comme les bactéries (102, 105), le MnO_2 (7), les poussières de coton (98-103,122), les endotoxines (112-113,52), la fumée de tabac (97).

En étudiant des animaux ordinaires, on remarque que les cobayes témoins ont un nombre de cellules libres supérieur à celui trouvé chez les rats témoins. Une exposition au LPS provoque chez les deux espèces une réaction de même type, mais beaucoup moins importante chez le rat. En utilisant des animaux bactériologiquement contrôlés (pathogen free), Rylander a montré que les cobayes ont un nombre de cellules libres beaucoup plus faible que les animaux ordinaires (98). Moeller et coll (70) ont montré que deux souches de

souris ayant une sensibilité différente à l'effet léthal de l'endotoxine montrent des différences dans l'amplitude de la réponse leucocytaire après injection aiguë intrapéritonéale de LPS. La souche sensible (C₃Heb/Fej) ne montre qu'une faible augmentation du nombre de leucocytes alors que la souche résistante (C₃G/Hej) a une réaction importante. Ces deux souches sont connues pour avoir une réponse immune différente après injection de LPS, la souche résistante ne produisant pas la forte réponse in vivo (IgG, IgM) observée chez les souris sensibles. De plus, les cellules B de la souche résistante ne répondent pas à l'activité mitogène de LPS. Les différences dans le comportement immun de ces deux souches de souris sont dues à des facteurs génétiques différents.

Moeller et coll pensent qu'il y a un rapport direct entre la forte sensibilité de la réaction inflammatoire et l'absence de réaction immune. La différence de sensibilité montrée entre les rats et les cobayes a également été décrite par Walker et coll (122) qui avaient exposé ces deux espèces à diverses poussières de coton. Les cobayes et les rats ont une production d'IgG et IgM sériques après une immunisation au LPS. Le cobaye développe la plus forte réponse inflammatoire et a également le titre d'anticorps le plus élevé. Le rat développe une faible réaction inflammatoire et a une réponse immune plus basse (90). La différence de réponse leucocytaire ne peut donc être due aux mêmes raisons que celle décrite pour les souches de souris sensibles et non sensibles. L'homme étant très sensible aux endotoxines, il convient de choisir le cobaye comme animal d'expérience.

6.2.2 Les macrophages

Les macrophages sont traditionnellement considérés comme responsables de l'épuration des alvéoles, ils doivent maintenir la stérilité et la propreté de la surface interne du poumon (14). La distinction que nous avons faite à l'aide de notre méthode ne permet pas de différencier entre le macrophage alvéolaire mature, le monocyte et les divers stades de différenciation du macrophage. Une telle différenciation nécessite une étude au microscope électronique qu'il ne nous était pas possible d'appliquer ici.

Les macrophages alvéolaires sont soit dérivés des monocytes sanguins, soit proviennent de cellules " précurseurs " présentes dans le tissu pulmonaire interstitiel (12). Bowden et Adamson n'ont pu mettre en évidence une synthèse d'ADN par des macrophages recueillis par lavage (13). Récemment, Brain et coll. soulignent la double origine du macrophage pulmonaire et précisent qu'actuellement, les données ne permettent pas de savoir quelle provenance une stimulation suscite préférentiellement (16).

La présence de macrophages matures dans le tissu pulmonaire et au niveau des surfaces alvéolaires et leur division expliquent la rapidité de la réponse dans les voies aériennes après une irritation. Les macrophages alvéolaires ont une fonction de phagocytose des particules inhalées et des micro-organismes infectieux.

Les résultats obtenus dans ce travail montrent que l'inhalation d'*Enterobacter* ou de LPS influence le nombre de macrophages de façon identique. Les macrophages ne détoxifient pas le LPS (10), leur rôle après inhalation d'endotoxine peut être un rôle d'intermédiaire dans le mécanisme d'invasion par les neutrophiles (54) ou dans la

réponse immune (110). Ce dernier rôle du macrophage n'ayant cependant pas encore été démontré pour les macrophages alvéolaires.

Une exposition aiguë au LPS provoque une légère diminution du nombre de macrophages dans les heures qui suivent l'exposition. Une diminution du nombre de macrophages après exposition à la fumée de tabac a été décrite par Rylander (94) et au MnO_2 (7).

La valeur normale de la vitesse d'évacuation par la voie muco-ciliaire est de 10^6 cellules par heures selon les données de Watson (126). La diminution du nombre de macrophages peut être due à une vitesse d'évacuation plus rapide dès le début de l'inhalation, cette évacuation précéderait l'afflux de nouvelles cellules.

Une autre raison de cette diminution serait due à une augmentation de l'adhérence des macrophages au moment de l'inhalation ne permettant pas leur récolte avec le liquide de lavage. L'inhalation de particules étrangères peut également influencer les mécanismes responsables de l'afflux des macrophages et de leur multiplication locale.

Après une exposition aiguë au Gram-négatif et au LPS, le nombre maximum de macrophages est atteint après 3 jours. La même cinétique a été décrite après injection intrapéritonéale de LPS chez des souris et lavage intrapéritonéal (70).

Après 10 jours d'exposition quotidienne, on voit que, dès la fin de la dernière exposition, le nombre de macrophages est significativement supérieur aux valeurs des animaux témoins. Nous avons obtenu les mêmes résultats chez des cobayes exposés à des poussières de coton contaminées par

des souches Gram-négatives (106). En effet, nous avons exposé des cobayes à la poussière de coton pendant des périodes de 1 jour, 3 jours, 5 jours, 10 jours et 15 jours. Les comptages des cellules libres n'ont montré une augmentation du nombre de macrophages qu'après une exposition de 3 jours et se maintenait au même niveau si l'exposition se poursuivait jusqu'à 15 jours. 72 heures après la dernière exposition le nombre de macrophages a significativement diminué, mais son niveau est encore significativement élevé par rapport aux témoins.

Une pré-exposition de 10 jours ne semble pas influencer la cinétique de l'invasion des bronches par les macrophages. Les comptages pris aux différents temps après l'exposition supplémentaire suivant les 3 jours de repos ne sont pas différents de ceux après une exposition aiguë ou une exposition de 10 jours. On voit donc que pendant une exposition sub-chronique, la stimulation est continue et que même pendant un arrêt d'exposition de 3 jours, le nombre de macrophages libres dans les bronches reste élevé. Ces expositions de 10 jours sont relativement courtes et ne nous permettent pas de tirer des conclusions quant aux conséquences d'une vraie exposition chronique. Il faudrait effectuer des expositions plus longues de 20, 30 jours et éventuellement de plusieurs mois pour voir l'établissement d'une adaptation de l'organisme qui pourrait se manifester par une diminution de l'invasion cellulaire.

Ce type de recherche est important car dans l'industrie la symptomatologie décrite après inhalation de Gram-négatif et d'endotoxines est généralement liée à des concentrations particulièrement élevées de bactéries ou de LPS. On ne peut cependant exclure la présence continue d'une faible quantité de Gram-négatifs ou de LPS. Cette quantité ne provoquerait pas de symptômes chez les personnes exposées, mais une

irritation continue au niveau des bronches. On ne connaît pas les effets à long terme d'une telle irritation.

Le mécanisme responsable de l'augmentation du nombre de macrophages alvéolaires n'est pas connu. Dans une étude récente sur l'activité chimiotactique des macrophages de cobayes *in vitro*, Dauber et Daniele (23) ont mis en évidence des différences de comportement entre le macrophage alvéolaire et le macrophage péritonéal face à différents facteurs chimiotactiques (sérum de cobaye activé par de l'endotoxine, un facteur dérivé des lymphocytes, un facteur dérivé des bactéries et les peptides N-formyl-methionyl-alanine (F-Me Ala) et N. formyl-methionyl-phenylalanine (F-Met-Phe)). Tous ces facteurs ont stimulé également la migration des macrophages péritonéaux alors que la migration des macrophages alvéolaires était variable : les peptides ont provoqué une migration semblable pour les deux types de macrophages, les facteurs dérivés des lymphocytes et des bactéries ont provoqué une migration moins importante des macrophages alvéolaires alors que le sérum de cobaye activé par l'endotoxine n'a provoqué qu'une réponse faible. Cette dernière réponse n'a pas été affectée par des modifications du milieu telles que variations du pH ou de la P_{O_2} . La réponse *in vitro* des macrophages alvéolaires à différents facteurs chimiotactiques permet aux auteurs de conclure que le chimiotactisme doit être un mécanisme de recrutement de ces cellules *in vivo*.

Les macrophages alvéolaires jouent un rôle primordial dans les mécanismes de défense pulmonaire. Ce rôle ne se limite pas à la phagocytose et à l'élimination des particules. Il est essentiel de proposer des modèles expérimentaux permettant d'estimer leur rôle dans d'autres mécanismes de défense tels que l'invasion leucocytaire et la réponse immune pulmonaire.

6.2.3 Les leucocytes

Dans l'étude de la cinétique de l'invasion cellulaire après inhalation d'*Enterobacter* et de LPS, nous avons groupé sous le terme de leucocytes les types cellulaires tels que les neutrophiles, les éosinophiles, les monocytes.

Une exposition aiguë à *Enterobacter* ou au LPS de *E.Coli* 026-B6 provoque une réponse leucocytaire (neutrophiles + eosinophiles) comparable . La même évolution a été décrite après une exposition aiguë à des poussières de coton contaminées par des germes Gram-négatifs (100). L'examen des animaux dès la fin de l'exposition montre que l'invasion par les leucocytes commence immédiatement. Le maximum de la réaction est atteint environ 24 heures après. Cette augmentation est essentiellement due à l'augmentation du nombre de neutrophiles.

Si on procède à 10 expositions quotidiennes consécutives, le nombre maximum de leucocytes est atteint dès la fin de la dernière exposition et se maintient 24 heures. Cette augmentation est sensiblement supérieure à celle obtenue après une exposition aiguë. La diminution qui s'amorce à 48 h. après une inhalation de LPS n'est pas retrouvée après une inhalation de bactéries vivantes ce qui souligne que l'élimination de celles-ci est beaucoup plus difficile.

Le décalage de la réaction leucocytaire peut s'expliquer par une mobilisation des leucocytes sanguins au niveau pulmonaire pour permettre leur migration vers les voies aériennes. En effet, avant une première exposition, les leucocytes ne sont pas présents dans les poumons, par contre, une succession d'inhalations quotidiennes peut amener et maintenir une grande quantité de leucocytes dans les poumons, ceux-ci n'ayant plus qu'à migrer vers les bronches s'il y a une

nouvelle irritation. En observant les leucocytes sanguins, Snell (111) a décrit un phénomène parallèle : une leucopénie suivie d'une leucocytose qui s'explique bien par une mobilisation des leucocytes au niveau pulmonaire provoquant la leucopénie sanguine, suivie par une stimulation régulière de la production de leucocytes pour assurer leur distribution dans les poumons.

Dans les trois jours qui suivent l'arrêt d'une exposition de 10 jours, nous notons une diminution rapide du nombre de leucocytes chez le cobaye. La diminution est moins marquée chez le rat. Si nous procédons alors à une exposition supplémentaire après 3 jours d'arrêt une augmentation similaire du nombre de polymorphonucléaires est observée montrant qu'après 10 jours d'exposition quotidienne aucun signe d'adaptation n'apparaît. Il faut ici réitérer les remarques faites à propos des macrophages, c'est-à-dire souligner la nécessité d'étudier les effets d'expositions plus longues, à de faibles concentrations afin d'élucider les effets d'une irritation continue des bronches. Nous avons vu que les leucocytes décrits dans ce paragraphe comprennent deux types importants de cellules les neutrophiles et les éosinophiles.

Les neutrophiles accumulés sur le lieu d'une inflammation proviennent de la moelle osseuse, via le compartiment vasculaire. La production des neutrophiles et leur stockage dans la moelle dure environ 12 jours, leur séjour dans le sang est d'environ 10 jours puis ils migrent vers les tissus où ils ont un rôle de phagocytose, ils n'y survivent que quelques jours. Ce sont des cellules très différenciées, incapables de multiplication (50). La principale fonction des neutrophiles est l'ingestion et la destruction des micro-organismes infectieux. Une déficience dans leur activité chimiotactique ou une agranu-

locytose caractérisée par une absence de neutrophiles provoquent chez les personnes atteintes une susceptibilité anormale aux infections. (85).

Dans le phénomène inflammatoire, les neutrophiles libèrent des enzymes hydrolytiques qui peuvent être néfastes pour l'hôte. On leur attribue également un rôle important dans la génération de facteur pyrogène (50).

Le faible nombre de neutrophiles présents dans les bronches des cobayes témoins confirme l'absence d'un état infectieux (96). Après exposition au LPS, les neutrophiles forment la fraction des polymorphonucléaires qui augmente le plus significativement.

Les neutrophiles peuvent altérer la capacité des endotoxines d'induire la réaction de Schwartzman chez le lapin (75). Leur présence après inhalation de LPS est donc justifiée par leur rôle de détoxification . Si on cesse l'exposition la population des neutrophiles est la première à diminuer en nombre, cette disparition rapide des neutrophiles est expliquée par leur courte durée de vie dans les tissus, ce sont des cellules très différenciées, incapables de se multiplier ou de se régénérer, leur durée de vie dans les tissus est d'environ deux jours (50).

Les cobayes témoins ont une proportion d'éosinophiles pulmonaires plus importante que chez les autres espèces. Ce type de polymorphonucléaires est le plus souvent lié à une réaction anaphylactique ou réponse immune de type I. Gorenberg et Daniele relèvent que les cobayes développent très facilement une réaction allergique et considèrent que ce type de réponse doit être une forme de défense importante pour cette espèce (46).

L'éosinophilie pulmonaire des cobayes n'est pas retrouvée dans la formule sanguine qui est très proche de la formule sanguine normale humaine (27). La présence d'histamine retient les éosinophiles dans un tissu. Le tissu pulmonaire du cobaye est riche en cellules mastocytaires qui libèrent de l'histamine, ce simple fait peut expliquer la présence d'une forte proportion d'éosinophiles chez des cobayes témoins (76). La libération d'histamine par les cellules mastocytaires serait due à une irritation permanente du tissu pulmonaire à cause de son exposition continue à l'environnement aérien.

L'augmentation significative par rapport aux valeurs des témoins du nombre d'éosinophiles après 10 jours d'exposition peut être due à la présence de complexes immuns formés par les IgG présentes dans les bronches (58).

6.2.4 Invasion leucocytaire et complément

Les LPS bactériens activent in vitro le complément sérique provoquant ainsi la libération d'un facteur chimiotactique pour les mononucléaires et les polymorphonucléaires (40,41). La réaction cellulaire que nous avons observée au niveau des voies aériennes après inhalation de LPS pouvait être le résultat d'une telle activation.

Nous avons voulu vérifier si cette observation se confirmait dans un système in vivo, au niveau pulmonaire. Nos résultats ne sont pas compatibles avec l'hypothèse d'un rôle actif du complément pour la mobilisation leucocytaire dans les poumons.

De plus, nous n'avons pu mettre en évidence d'activité hémolytique (CH 50) dans le liquide de lavage

bronchique des cobayes.

Le zymosan est un activateur connu du complément (28). Nous l'avons utilisé pour effectuer une série d'inhalations et d'injections intratrachéales. En supposant vraie la présence de complément dans les bronches, on pouvait donc s'attendre à une forte invasion leucocytaire provoquée par la libération de facteur chimiotactique par la dégradation des composants $C_3 - C_9$.

Contrairement à cette attente, nous n'avons mis en évidence aucune modification de la population leucocytaire des voies aériennes après cette inhalation. L'augmentation significative du nombre de macrophages montre que le zymosan a atteint les bronches.

L'absence d'une réaction leucocytaire après inhalation de zymosan ainsi que le maintien d'une réaction chez les animaux décomplémentés nous portent à proposer que le complément ne joue pas un rôle important pour la mobilisation des leucocytes dans les poumons.

Les données de la littérature concernant la présence de complément dans les bronches sont controversées. Certains auteurs, comme Reynolds et coll n'ont dosé que 0,1 % de l'activité mesurée dans le serum (lapin). Ces auteurs considèrent leur test très sensible et par conséquent ils estiment que cette faible quantité provient du serum par simple diffusion et qu'elle reste négligeable (86). Robertson et coll. (89) ont montré que les composants de la voie alternée du complément (C_3 à C_9) sont présents dans le liquide de lavage humain. Ils n'ont pas dosé quantitativement le complément, mais ils ont utilisé un test fonctionnel consistant à provoquer la consommation de l'activité hémolytique du C_3 en l'incubant avec du liquide de lavage et en ajoutant respectivement soit

du LPS, soit du CVF qui activent la voie alternée soit par l'intermédiaire de la properdine, soit sans la properdine. Leurs résultats montrent que le C_3 + LPS seul, ou CVF seul ou le liquide de lavage seul, ne perd par son activité hémolytique alors qu'une incubation de C_3 + LPS + liquide ou C_3 + CVF + liquide fait disparaître cette activité. Les auteurs ont attribué cela à la présence de tous les composants de la voie alternée du complément dans le liquide bronchique, l'origine de ce complément bronchique n'est pas discutée par ces auteurs. On peut concevoir une origine sérique comme Reynolds et coll, ou une origine macrophagique (6).

On ne peut pas définitivement exclure le complément dans les réactions pulmonaires, en effet, la présence de récepteurs du C_3 sur les membranes des macrophages alvéolaires humains est connue (88). Le phénomène d'opsonisation avec les IgG qui nécessite la présence du complément a été démontré par les mêmes auteurs pour l'élimination de *Pseudomonas aeruginosa* (87). Cependant, un système du complément sérique intact n'est pas indispensable pour l'élimination de toutes les souches bactériennes. Gross et coll (45) l'ont démontré. Ils ont pu mettre en évidence que la décomplémentation de souris affecte l'élimination de *S. Pneumoniae* et *P. aeruginosa* mais qu'elle ne semble pas affecter celle de *K. pneumoniae* et *S. aureus*.

Nos résultats proposent que le complément n'a pas une importance prépondérante dans la mobilisation des leucocytes, il faut expliquer celle-ci par d'autres mécanismes: soit une action directe du LPS, soit une action indirecte, par l'intermédiaire des macrophages alvéolaires. En ce qui concerne une action chimiotactique directe du LPS, les données de la littérature sont divergeantes. En effet, Mergenhagen (67) a montré que le LPS en présence de sérum inactivé n'a pas

de pouvoir chimiotactique. Keller et Sorkin (58) ont de leur côté montré une activité chimiotactique à l'égard des neutrophiles de cobayes en les incubant dans un chambre de Boyden avec le surnageant d'une culture de E.Coli. Moeller et coll. ont montré que les neutrophiles de souris résistantes et de souris sensibles aux endotoxines ne sont pas capables de répondre chimiotactiquement directement au LPS (70).

On peut également imaginer que l'inhalation de LPS provoque une activation des macrophages alvéolaires qui seraient alors le principal intermédiaire de la réaction leucocytaire au niveau des voies aériennes. Hunninghake et coll. (54) ont pu mettre en évidence que des macrophages alvéolaires sécrètent un facteur chimiotactique pour les neutrophiles. Par un test in vitro ces auteurs ont mis en évidence la sécrétion d'un facteur chimiotactique par les macrophages alvéolaires ayant phagocyté des S.aureus tués par la chaleur. Ce facteur chimiotactique aurait un faible poids moléculaire de 5000 daltons, et il serait généré aussi bien in vivo que in vitro. Cette étude montre que le macrophage alvéolaire peut être un initiateur de l'inflammation des bronches par la sécrétion d'un médiateur de la locomotion des neutrophiles.

Il est nécessaire de vérifier si la sécrétion d'un tel facteur a un caractère spécifique et si elle peut également survenir après inhalation de bactéries à Gram-négatif ou d'endotoxines. Il faut confirmer les résultats obtenus in vivo par des expériences in vitro, permettant de mieux contrôler les différents facteurs en présence.

6.2.5 Production d'anticorps

Les résultats obtenus après l'exposition de rats au LPS de E.Coli O26-B6 montrent que l'inhalation d'endotoxine provoque une production locale d'anticorps spé-

cifiques, du type IgG et IgA, et une réponse sérique en IgG et IgM et IgA.

Les IgA sont sécrétées au niveau des voies aériennes supérieures, alors que les IgG représentent les immunoglobulines des voies inférieures (57, 120). Les données de la littérature ne parlent pas de la présence d'IgM dans les sécrétions bronchiques. La présence d'anticorps circulants après immunisation avec un aérosol est connue.

Après immunisation intra-nasale avec P.aeruginosa, Reynolds et coll ont mis en évidence, chez le lapin, la présence d'IgG et d'IgM sériques ainsi que des IgA et des IgG dans le liquide de lavage des bronches (87). Ceci coïncide avec nos résultats. Dans notre expérience, la presque totalité des animaux a montré un titre positif d'IgA anti-LPS O26 B6 dans le liquide bronchique.

Moins de 30 % des animaux exposés ont un taux mesurable d'IgG dans le liquide bronchique. Nous n'avons pas essayé de déterminer l'origine de ces anticorps et par conséquent nos résultats ne permettent pas d'affirmer s'ils ont été synthétisés localement, ou s'ils proviennent du sang. En effet, ces IgG auraient pu s'infiltrer dans les bronches par simple diffusion physiologique, ou à cause d'une augmentation de la perméabilité vasculaire due à la réaction inflammatoire après inhalation de LPS (33). Ils ont pu également s'infiltrer lors du passage des macrophages et des leucocytes vers les voies aériennes. Les macrophages porteurs de récepteurs IgG peuvent également jouer le rôle de véhicule.

La procédure de lavage a pu provoquer la rupture de petits vaisseaux. Une production locale d'IgG est également possible (57). De plus Reynolds et coll ont confirmé leur présence dans les bronches après immunisation par Pseudomonas et leur importance dans le phénomène d'opsonisation (86).

Contrairement au nombre de cellules libres qui est influencé par un arrêt d'exposition, le taux d'IgA ne subit aucune modification pendant l'arrêt de 3 jours qui suit une exposition sub-chronique et une exposition supplémentaire ne semble pas l'influencer.

Ces données suggèrent que les symptômes périodiques ressentis par les patients byssinotiques ne sont pas associés avec des variations du taux d'IgA dans le liquide bronchique.

6.2.6 Effets sur la réponse immune primaire du poumon

Les résultats que nous avons obtenus chez des animaux ayant inhalé une suspension d'*Enterobacter* et de LPS pendant 10 jours montrent une tendance vers une diminution de la capacité de réponse immune primaire. Après un mois d'exposition, la tendance que nous mettons en évidence est une augmentation de la capacité de réponse immune. Ces tendances, même faibles, sont soutenues par des données de la littérature concernant la réponse immune primaire de la rate après injection de LPS. Diamanstein et coll ont montré que l'injection de fortes doses d'activateurs de cellules B polyclonales : LPS, PPD, DxS (dextran sulfate) et PAAC (acide polyacrylique) suppriment la réponse immune aux globules rouges injectés quelques jours plus tard (25).

Bradley-Mullen et coll (17) ont provoqué une suppression de la réponse immune primaire humorale (IgM) en injectant simultanément au polysaccharide de pneumococque type III (S III) du LPS. Cette suppression serait due, d'après ces auteurs à une action directe des LPS sur les cellules B. Enfin, Persson (80) a décrit une suppression de la réponse primaire de la rate aux globules rouges de mouton chez des souris injectées intrapéritonéalement avec du LPS quelques

jours avant l'immunisation. Selon elle, les cellules spléniques responsables de cette suppression seraient les cellules B. Toutes les données citées ci-dessus ont été obtenues avec des cellules spléniques ; nos résultats montrent que le comportement des lymphocytes pulmonaires est également influencé par le LPS.

On explique la suppression de la réponse primaire par l'activité fortement mitogène du LPS. Cette activité provoquerait une division précoce et/ ou une différenciation d'une sub-population de cellules B jeunes qui ne pourraient plus se transformer en cellules produisant des IgM. L'augmentation de la capacité de réponse immune après une plus longue exposition est aussi expliquée par l'action mitogène des LPS. Dans ce cas, il agirait sur des cellules B sensibilisées à un antigène. Stimulées par le LPS, les cellules B produiraient plus d'anticorps spécifiques. L'action du LPS sur la réponse immune primaire dépend de la dose et du moment de l'administration (34).

En accord avec la propriété mitogène des LPS sur les lymphocytes B (4), Mattsby et Rylander ont montré que dans une usine d'épuration des eaux, les ouvriers les plus exposés aux poussières riches en bactéries à Gram-négatif, avaient des taux d'anticorps anti DNP-HSA plus élevés que les ouvriers moins exposés.

Les effets de l'inhalation d'autres polluants sur la réponse immune ont déjà été décrits. Dans une étude détaillée, de la réponse immune de la souris, après inhalation de fumée de cigarette, Thomas et Holt ont mis en évidence une augmentation suivie de diminutions significatives du nombre de plaques d'hémolyse. Ces modifications ont été montrées lors de la réponse primaire de la rate et des ganglions médiastinaux et cervicaux après immunisation intra-péritonéale (118)

et des poumons après immunisation intra-trachéale (119).

Zarkower a décrit le même phénomène chez des souris exposées au carbone ou au SO_2 puis aux deux ensembles. Après une augmentation de la réponse à 135 jours, il a observé une diminution significative du nombre de plaques d'hémolyse après 192 jours (128).

Ces auteurs n'ont pas décrit de modifications de la réponse secondaire.

La situation expérimentale que nous avons utilisée ne reflète pas une situation de la vie réelle. En effet, une exposition unique à un antigène est rare et généralement on subit une exposition répétée qui provoque pas conséquent une réponse secondaire chez l'hôte. Il est donc difficile d'établir une relation directe entre les modifications de la capacité de réponse immune primaire et une situation clinique; cependant les données suggèrent que l'inhalation d'un polluant ou de plusieurs simultanément peut influencer les mécanismes de défense pulmonaire. Des recherches sont encore nécessaires afin d'évaluer les effets pour la santé d'une exposition à long terme.

7. CONCLUSIONS

L'inhalation d'*Enterobacter* ou d'endotoxine de *E.coli* provoque chez l'animal une invasion des bronches par les macrophages et les polymorphonucléaires. Le maximum de la réaction est atteint après 24 heures. Puis le nombre de cellules diminue et après 3 jours, la réaction a disparu.

Chez les animaux soumis à une exposition répétée pendant 10 jours, le nombre de polymorphonucléaires reste élevé. Il tombe dès l'arrêt des expositions et atteint la valeur des témoins après 72 heures. Une nouvelle exposition après 3 jours d'arrêt provoque un afflux cellulaire de même importance que l'exposition aiguë.

La réponse des polymorphonucléaires est peu influencée par une décomplémentation des animaux. Aucune réaction n'est observée après une exposition au Zymosan.

Les résultats montrent que l'inhalation d'endotoxine provoque une réponse inflammatoire dans les bronches et suggèrent que cette réponse n'est pas réglée par une activation du complément.

L'exposition à l'endotoxine de *E.coli* induit après 10 jours le développement d'une réponse immune dans les poumons et dans le serum. Une réponse en IgA dans les voies aériennes a été mesurée chez tous les animaux. La moitié des animaux avait un taux d'IgG mesurable. On n'a détecté aucune réponse en IgM dans les bronches. Dans le serum, les IgG et IgM n'étaient présents que dans la moitié des animaux exposés.

Ces données proposent que l'évaluation de la production d'anticorps anti-endotoxine après inhalation doit être faite dans les poumons.

Une exposition aux endotoxines inhalées influence aussi la capacité de réponse immune générale. Après 10 jours d'exposition, on remarque une dépression de cette capacité suivie par une augmentation après un mois d'exposition.

Ces résultats suggèrent que l'exposition aux endotoxines peut avoir comme conséquence un changement de la réponse immune à d'autres facteurs comme les microbes.

La relation entre les effets observés chez les animaux exposés aux endotoxines et une situation où l'homme serait exposé aux endotoxines dans le milieu professionnel ou général reste encore à préciser. Le parallélisme entre l'invasion leucocytaire et l'apparition de la fièvre dans les cas de " Mill fever " ou de fièvre des humidificateurs conduit à conclure que l'invasion leucocytaire est le mécanisme responsable des symptômes observés chez l'homme. Ces symptômes qui se développent dans différents milieux, peuvent être désignés par le terme de " fièvre des endotoxines " (endotoxin fever). L'invasion des polymorphonucléaires après un arrêt d'exposition et le développement d'une réponse immune locale permettent de poser des hypothèses concernant les mécanismes responsables des symptômes de la byssinose.

8. RESUME

Dans ce travail expérimental, nous avons étudié les effets pulmonaires de l'inhalation de bactéries à Gram-négatif et d'endotoxines.

Après une introduction générale, nous avons donné une brève description, selon la littérature, des effets provoqués par l'administration d'endotoxines bactériennes. Le troisième chapitre est une revue de la littérature concernant les études cliniques sur les effets des endotoxines ou des Gram-négatifs inhalés, suivie par une revue des études expérimentales consacrées à ce sujet.

Le chapitre suivant décrit le travail expérimental que nous avons exécuté. Après une description des méthodes utilisées, nous présentons les résultats obtenus après exposition aiguë et sub-chronique à un aérosol d'Enterobacter ou d'endotoxine de Escherichia Coli. Chez les animaux, nous avons étudié la cinétique de l'invasion leucocytaire des bronches dans les heures et les jours qui suivent l'inhalation. Nous avons également étudié l'importance d'une pré-exposition et le rôle de complément dans le développement de cette réaction.

Nous avons chez des rats exposés pendant 10 jours déterminé la production d'anticorps locaux et sériques. Enfin, nous avons étudié l'effet d'une exposition sub-chronique sur la capacité de réponse immune locale chez des cobayes, au moyen de la technique des plaques d'hémolyse.

La discussion nous permet de souligner que les endotoxines peuvent provoquer une réponse inflammatoire dans les poumons. La présence de germes à Gram-négatif ou de leurs endotoxines dans l'air peut donc constituer un risque réel pour les personnes exposées. Nos résultats permettent de formuler les hypothèses sur les mécanismes responsables de l'invasion leucocytaire des voies aériennes et sur les effets d'une exposition sur les mécanismes de défense locaux.

REFERENCES

-) Adams P.A., Spendlove J.C. Coliform aerosols emitted by sewage treatment plants.
Science, 1970, 169 : 1218
-) Ahlstedt S., Carlsson B., Hanson L.A., Kaijser B., Mattsby-Baltzer I., Sohl-Akerlund A. Application of the ELISA for determination of immunoglobulin class specific *Escherichia coli* antibodies.
Scandinavian Journal of Immunology, 1978, 8, suppl. 7 : 119
-) Allison A.C., Ferluga J., Prydz H. and Schorlemmer H.U. The role of macrophage activation in chronic inflammation.
Agents and Actions, 1978, 8 : 1
-) Andersson I., Sjorberg O., Möller G. Mitogens as probes for immunocytes activation and cellular cooperation.
Transplantation Reviews, 1972, 11 : 131
-) Atterholm I., Ganrot-Norlin K., Hallberg T., Ringertz O. Unexplained acute fever after a hot bath.
Lancet, 1977, 8040 : 684
-) Bentley C., Bitter-Suermann D., Hadding U., Brade V. In vitro synthesis of factor B of the alternative pathway of Complement activation by mouse peritoneal macrophage.
European Journal of Immunology, 1976, 6 : 393
-) Bergström R. Acute pulmonary toxicity of manganese dioxide.
Scandinavian Journal of Work, Environment and Health, 1977, 3, suppl. 1: 1
-) Berry L.J. Metabolic effects of bacterial endotoxins.
IN : Kadis S., Weinbaum G., Ajl S.J.(ed). Microbial toxins (vol. V), bacterial endotoxins (chap. 6):165-204. Academic Press, New-York, 1971.

- (9) Berry L.J. Bacterial toxins.
 CRC Critical Reviews in Toxicology,
 1977 : 239
- (10) Bona C.A. Fate of endotoxin in macrophages :
 biological and ultrastructural aspects :
 66-73.
 IN : Kass E.H., and Wolff S.M (ed)
 Bacterial lipopolysaccharides.
 The chemistry, biology and clinical
 significance of endotoxins.
 University of Chicago Press,
 Chicago, 1973.
- (11) Botzenhart K., On the growth of various Enterobacte-
 Kufferath R. riaceae, *Pseudomonas aeruginosa* and
 Alkaligenes spp. in distilled water,
 de-ionized water, tap water and mineral
 salt solution.
 Zentral Blatt für Bakteriologie und
 Hygiene, 1976 , 163 : 470
- (12) Bowden D.H., The pulmonary interstitial cell as
 Adamson I.Y. immediate precursor of the alveolar
 macrophage.
 American Journal of Pathology, 1972, 68:
 521
- (13) Bowden D.H., Adaptive responses of the pulmonary
 Adamson I.Y. macrophagic system to carbon : Kinetic
 studies.
 Laboratory Investigation, 1978, 38 : 422
- (14) Brain J.D. Free cells in the lungs, some aspects
 of their role, quantitation and
 regulation.
 Archives of Internal Medicine, 1970, 126:
 477

- 5) Brain J.D., Knudson D.E., Sorokin S.P., Davis M.A. Pulmonary distribution of particles given by intratracheal instillation or by aerosol inhalation.
Environmental Research, 1976, 11 : 13
- 6) Brain J., Golde D.W., Green G.M., Massaro D.J., Valberg P.A., Ward P.A., Werb Z. Biologic potential of pulmonary macrophages (Conference report).
American Review of Respiratory Disease, 1978, 118 : 435
- 7) Braley-Mullen H., Hayes N., Sanders M. Suppression of IgM responses to Type III pneumococcal polysaccharide by LPS.
Cellular Immunology, 1977, 30 : 300
- 8) Cavagna G., Foà V., Vigliani E.C. Effect in man and rabbits of inhalation of cotton dust or extracts and purified endotoxins.
British Journal of Industrial Medicine, 1969, 26 : 314
- 9) Cinkotai F., Lockwood M. and Rylander R. Airborne micro-organism and prevalence of byssinotic symptoms in cotton mills.
American Industrial Hygiene Association Journal, 1977, 38 : 554
- 0) Cluff L.E. Effects of Lipopolysaccharides (endotoxins) on susceptibility to infections : 399-413.
IN : Kadis S., Weinbaum G., Ajl S.J (ed). Microbial toxins (vol. V), Bacterial endotoxins (chap. 6). Academic Press, New-York, 1971.
- 1) Cottier H., Schaffner T., Chanana A.D., Joel D.D., Sordat B., Bryant B.J., Hess M.W. Species differences in the effectiveness of intestinal barriers against penetration of inert particulates and bacteria: 80-85.
IN : Urbaschek B., Urbaschek R. and Neter E. Gram-negative bacterial infections and mode of endotoxin actions, pathophysiological, immunological and clinical aspects. Springer Verlag, Wien, 1975.

- (22) Cunningham A.J., Szenberg A. Further improvements in the plaque technique for detecting single antibody forming cells.
Immunology, 1968, 14 : 599
- (23) Dauber J.H., Daniele R.P. Chemotactic activity of guinea pig alveolar macrophages.
American Review of Respiratory Disease, 1978, 117 : 673
- (24) De Blasi R., Squeri L., Quartarone F. Considerazioni sulla aerodiffusione di enterobatteri nei moderni impianti di ossidazione dei liquami.
Rivista Italiana Igiene, 1975, 35 : 147
- (25) Diamanstein T., Keppler W., Blistein-Williger E., Ben-Efraim S. Suppression of the primary immune response in vivo to sheep red blood cells by B-cell mitogens.
Immunology, 1976, 30 : 401
- (26) Di Luzio N.R., Friedmann T.J. Bacterial endotoxins in the environment
Nature, 1973, 6 : 49
- (27) Dudley B.S. Physiology.
IN : Wagner J.E., Manning P.J (ed).
The biology of the guinea pig
(Chap. 7) : 63-98. Academic-Press,
New-York, 1976.
- (28) Edwards J.H., Wagner J.C., Seal R.M.E. Pulmonary responses to particulate materials capable of activating the alternative pathway of Complement.
Clinical Allergy, 1976, 6 : 155
- (29) Edwards J.H., et al. Humidifier fever (report of a Symposium at the Medical Research Council UK).
Thorax, 1977, 32 : 653

- 30) Engvall E., Perlman P. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) quantitation of specific antibodies by enzyme labelled anti-immunoglobulin in antigen coated tubes.
Journal of Immunology, 1972, 109 : 129
- 31) Favero M., Petersen N., Carson L., Bond W., Hindman S. Gram-negative water bacteria in hemodialysis systems.
Health Laboratory Science, 1975, 12 : 321
- 32) Feldberg W. Body temperature and fever : changes in our views during the last decade.
Proceeding of the Royal Society of London, series B, Biological Sciences, 1975, 191 : 199
- 33) Fischer P., Millen E., Glauser F.L. Endotoxin-induced increased alveolar capillary membrane permeability.
Circulatory Shock, 1977, 4 : 387
- 34) Frantzl R.E., McMaster P.D. The primary immune response in mice : I. the enhancement and suppression of hemolysin production by a bacterial endotoxin.
Journal of Experimental Medicine, 1968, 127 : 1087
- 35) Friend J., Gaddie J., Palmer K., Pickering C., Pepys J. Extrinsic allergic alveolitis and contaminated cooling-water in a factory machine.
Lancet, 1977, 5 : 297
- 36) Fumarola D., Jirillo E. Limulus test, parenteral drugs and biological products : an approach.
Giornale di Batteriologia, Virologia ed Immunologia, 1976, LXIX : 1

- (37) Galanos C., Rietschel E.T., Lüderitz O., Westphal O. Interaction of Lipopolysaccharides and Lipid A with Complement.
European Journal of Biochemistry, 1971, 19 : 143
- (38) Galanos C., Lüderitz O., Rietschel E.T., Westphal O. Newer aspects of the chemistry and biology of bacterial Lipopolysaccharides, with special reference to their Lipid A component.
IN : Goodwin T.W (ed). Biochemistry of Lipids II. International review of biochemistry (vol. 14). Kornberg H.L., Phillips D.C (series editors). University Park Press, Baltimore, 1977.
- (39) Gans H., Matsumoto K. On the escape of endotoxin from the intestine : 429-435.
IN : Urbaschek B., Urbaschek R. and Neter E (ed). Gram-negative bacterial infections and mode of action of endotoxin ; pathophysiological, immunological and clinical aspects. Springer-Verlag, Wien, 1975.
- (40) Gewurz H., Mergenhagen S.E., Nowotny A., Phillips J.K. Interaction of the Complement system with native and chemically modified endotoxins.
Journal of Bacteriology, 1968, 95 : 397
- (41) Gewurz H., Snyderman R., Mergenhagen S.E., Shin, H.S. Effects of endotoxic Lipopolysaccharides on the Complement system : 127-149
IN : Kadis, S., Weinbaum G., Ajl S.J (ed). Microbial toxins, vol. V, Chap. 4. Academic Press, New-York 1971.

- 42) Graham J.A., Miller F.J., Daniels M.J., Payne E.A., Gardner D.E. Influence of cadmium, nickel and chromium on primary immunity in mice. *Environmental Research*, 1978, 16 : 77
- 43) Greisman S.H., Hornick R.B. Mechanisms of endotoxin tolerance with special reference to man. *Journal of Infectious Diseases*, 1973, 128 : 257
- 44) Greisman S.E., Young E.J., DuBuy B. Mechanisms of endotoxin tolerance : VIII. Specificity of serum transfer. *Journal of Immunology*, 1973, 3 : 1349
- 45) Gross N.G., Rehm S.R., Pierce A.K. The effect of Complement depletion on lung clearance of bacteria. *Journal of Clinical Investigation*, 1978, 62 : 373
- 46) Gorenberg D., Daniele R. Characterization of immunocompetent cells recovered from the respiratory tract and tracheobronchial lymph node of normal guinea pigs. *American Review of Respiratory Disease*, 1976, 114 : 1099
- 47) Hardegree M.C., Singer S.H., Gerone P.J. Effect of allergenic extracts of house dust and bacterial vaccine on respiratory infections of mice. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 1973, 51 : 1
- 8) Hellander, I. Communication personnelle.

- (49) Hinshaw L.B. Release of vasoactive agents and the vascular effects of endotoxin: 209-260.
IN: Kadis S., Weinbaum G., Ajl S.J (ed). Microbial toxins (vol. V) Bacterial endotoxins (Chap. 7). Academic Press, New-York, 1971.
- (50) Hirsch J.G. Neutrophil leukocytes : 411-447).
IN : Zweifach B.W., Grant L., McMilluskey R.T (ed). The inflammatory process. 2nd ed (Chap. 7, vol.1). Academic-Press, New-York, 1974.
- (51) Hoar R.M. Toxicology and teratology : 269
IN : Wagner J.E., Manning P.J (ed). The biology of the guinea pig. Academic Press, New-York, 1976.
- (52) Hudson A., Kilburn K., Halprin G., McKensie W. Granulocyte recruitment to airways exposed to endotoxin aerosol.
American Review of Respiratory Disease, 1977, 115 : 89
- (53) Hunninghake G.W., Fauci, A.S. Immunologic reactivity of the lung. V. Regulatory effects of antibody on the pulmonary immune response to locally administrated antigen.
Journal of Immunology, 1977, 118 : 1728
- (54) Hunninghake G.W., Gallin J.I., Fauci A.S. Immunologic reactivity of the lung : the in vivo and in vitro generation of a neutrophil chemotactic factor by alveolar macrophages.
American Review of Respiratory Disease, 1978, 117 : 15

- 55) Jorgensen J.H., Lee J.C.,
Pahren H.R. Rapid detection of bacterial endotoxins
in drinking water and renovated
wastewater.
Applied and Environmental Microbiology,
1976, 32 : 347
- 56) Kabat E.A., Mayer M.M. Procedure for the titration of
Complement : 135-139.
IN : Experimental immunochemistry (2nd
ed). Springfield (Ill.), Charles
C. Thomas, 1971.
- 57) Kaltreider H.B. Initiation of immune responses in
the lower respiratory tract with red
cell antigens.
IN : Kirkpatrick C.H., Reynolds H.Y
(ed). Immunologic and infectious
reactions in the lung. Dekker,
New-York, 1976.
- 58) Keller H.U., Sorkin E. Studies on chemotaxis : XIII. Diffe-
rences in the chemotactic response of
neutrophil and eosinophil polymorpho-
nuclear leucocytes.
International Archives of Allergy,
1969, 35 : 279
- 59) Kenline P.A., Scarpino
P.V. Bacterial air pollution from sewage
treatment plants.
*American Industrial Hygiene Association
Journal*, 1972, 33 : 346
- 60) Kohler P., Gross G.,
Salvaggio J., Hawkins J. Humidifier lung : hypersensitivity
pneumonitis related to thermotolerant
bacterial aerosol.
Chest, 1976, 69 : 294

- (61) Kux M., Coalson J.J.,
Massion W.H., Guenter C.
A. Pulmonary effects of E.Coli endotoxin:
role of leukocytes and platelets.
Annals of Surgery, 1972, 175 : 26
- (62) Lang C.M., Vesell E.S. Environmental and genetic factors
affecting laboratory animals : impact
on biomedical research.
Federation Proceedings, 1976, 35 :
1123
- (63) Maillard J.L., Zarco
R.M. Décomplémentations par un facteur
extrait du venin de cobra. Effet sur
plusieurs réactions immunes du cobaye
et du rat.
Annales de l'Institut Pasteur, 1968,
114 : 756
- (64) Masten J.M. Hospital infections with pigmented
water bacteria.
Health Laboratory Science, 1975, 12 :
305
- (65) Mattsby I., Rylander R. Clinical and biochemical findings in
workers exposed to sewage dust.
Journal of Occupational Medicine,
1978, 20 : 690
- (66) Montesana G., Deodato P.,
Balsamelli G.,
Curatolo G., Vaccaro S. Osservazioni sulla " sindrome del
lunedì " in un complesso industriale
tessile siciliano.
Folia Medica, 1968, 51 : 665
- (67) Mergenhausen S.E.,
Snyderman R., Gewurz H.,
Shin H.S. Significance of Complement to the
mechanism of action of endotoxin.
*Current Topics in Microbiology and
Immunology*, 1969, 50 : 37

- 68) Mergenhausen S.E.,
Snyderman R., Phillips
J.K. Activation of Complement by endotoxin:
78-82.
IN : Kass E.H., Wolff S.M (ed).
The chemistry, biology and clinical
significance of endotoxins.
University of Chicago Press,
Chicago, 1973.
- 69) Metzger J., Patterson R., Sauna takers disease : hypersensitivity
Fink J., Semerdjian R., pneumonitis due to contaminated water
Roberts M. in a home sauna.
*Journal of the American Medical
Association, 1976, 236 : 2209*
- 70) Moeller G.R., Terry L., The inflammatory response and resis-
Snyderman R. tance to endotoxin in mice.
Journal of Immunology, 1978, 120: 116
- 71) Möller G., Sjöberg O., Immunogenicity, tolerogenicity, and
Andersson J. mitogenicity of LPS : 44
IN : Kass E.H., Wolff S.M (ed).
Bacterial lipopolysaccharides,
the chemistry, biology and clinical
significance of endotoxins.
University of Chicago Press,
Chicago, 1973.
Journal of Infectious Diseases,
1973, 128 : 44
- 72) Moody M.R., Young V.M. Pseudomonas aeruginosa in a center for
Kenton D.M., Vermeulen cancer research : I. Distribution of
G.D. intraspecies types for human and
environmental sources.
Journal of Infectious Diseases,
1972, 125 : 95
- 73) Myrvold H.E. Experimental septic shock.
Acta Chirurgica Scandinavica, 1977, 470:
1

- (74) Neal P., Schneiter R., Caminata B. Report on acute illness among rural mattress makers using low grade, stained cotton.
Journal of the American Journal Association, 1942, 119 : 1074
- (75) Pal Yu B., Kummerow F.A., Nishida T. Acid phosphatases of rat polymorpho-nuclear leukocytes.
Proceedings for the Society of Experimental Biology and Medicine, 1966, 122 : 1045
- (76) Parish W.E. Substances that attract eosinophils in vitro and in vivo, and that elicit blood eosinophilia.
Antibiotics and Chemotherapy, 1974, 19 : 233
- (77) Patterson R., Fink J.N., Roberts M., Kelly J.F., Sommers H.M. Antibody activity in sera of patients with humidifier disease. Studies of the water supply as a source of antigen
Journal of Allergy and Clinical Immunology, 1978, 62 : 103
- (78) Pennington D.G., Hyman A.L., Jaques W.E. Pulmonary vascular response to endotoxin in intact dogs.
Surgery, 1973, 73 : 246
- (79) Pernis B., Vigliani E.C., Cavagna C., Finulli M. The role of bacterial endotoxins in occupational diseases caused by inhaling vegetable dusts.
British Journal of Industrial Medicine, 1961, 18 : 120
- (80) Persson U. Lipopolysaccharide-induced suppression of the primary immune response to a thymus-dependent antigen.
Journal of Immunology, 1977, 118 : 789

- 31) Peterson R., Wickland P., Good R.A. Endotoxin activity of a house dust extract.
Journal of Allergy, 1964, 35 : 134
- 32) Phillip-Dormston W.K., Siegert R. Prostaglandins of the E and F series in rabbit cerebrospinal fluid during fever induced by Newcastle Disease Virus, E.Coli endotoxin and endogenous pyrogen.
Medical Microbiology and Immunology, 1974, 59 : 279
- 33) Pickering C.A.C., Moore W.K.S., Lacey J., Holford-Strevens V.C., Pepys J. Investigation of a respiratory disease associated with an air-conditioning system.
Clinical Allergy, 1976, 6 : 109
- 34) Pierce A.K., Reynolds, R.C., Harris G.D. Leukocytic response to inhaled bacteria.
American Review of Respiratory Disease, 1977, 116 : 679
- 35) Quie P.G., Cates K.L. Clinical manifestations of disorders of neutrophil chemotaxis: 307-324.
IN : Gallin, J.I., Quie P.G (ed). Leukocytes chemotaxis. Raven Press, New-York, 1978.
- 36) Reynolds, H.Y., Russell, E.T. Pulmonary host defenses. I. Analysis of protein and lipids in bronchial secretions and antibody responses after vaccination with *Pseudomonas aeruginosa*: 358.
II. Interaction of respiratory antibodies with *P. aeruginosa* and alveolar macrophages : 369.
Journal of Immunology, 1973, 3.

- (87) Reynolds H. Y.,
Thompson R.E., Delvin
H.B. Development of cellular and humoral
immunity in the respiratory tract of
rabbits to *Pseudomonas* LPS.

Journal of Clinical Investigation,
1974, 53 : 1351
- (88) Reynolds H.Y.,
Atkinson J.P., Newball,
H.H., Frank M.M. Receptors for immunoglobulin and
Complement on human alveolar macro-
phages.

Journal of Immunology, 1975, 114: 1813
- (89) Robertson J., Caldwell
J.R., Castle J.R.,
Waldman R.H. Evidence for the presence of components
of the alternative (properdin) pathway
of Complement activation in respiratory
secretions.

Journal of Immunology, 1976, 117: 900
- (90) Rudbach J.A. Immunogenicity of Lipopolysaccharides.

IN : Beers R.F., Bassett E.G (ed).
The role of immunological factors
in infectious, allergic and
autoimmune processes. Eighth Miles
International Symposium. Raven
Press, New-York, 1976.
- (91) Russell R.R.B. Free endotoxin - a review.

Microbios Letters, 1976, 2 : 125
- (92) Ryan K.J., Mihalyi S. Evaluation of a simple device for
bacteriological sampling of respira-
tor- generated aerosols.

Journal of Clinical Microbiology,
1977, 5 : 178
- (93) Rylander R. Pulmonary defense mechanisms to
airborne bacteria.

Acta Physiologica Scandinavica,
1968, suppl. 306 : 1

- [94] Rylander R. Free lung cell studies in cigarette smoke inhalation experiments.
Scandinavian Journal of Respiratory Diseases, 1971, 52 : 121
- [95] Rylander R.,
Hellström P.A. Versatile cage for environmental protection housing of research animals.
Laboratory Animals Sciences, 1973, 23 : 876
- [96] Rylander R. Influence of infection on pulmonary defense mechanisms.
Annals of the New-York Academy of Sciences, 1974, 221 : 282
- [97] Rylander R. Pulmonary cell responses to inhaled cigarette smoke.
Archives of Environmental Health, 1974, 29 : 329
- [98] Rylander R.,
Nordstrand A. Pulmonary cell reactions after exposure to cotton dust extract.
British Journal of Industrial Medicine, 1974, 31 : 220
- [99] Rylander R., Snella M.C. Bacterial contamination of cotton as a factor determining its pulmonary toxicity: 101-109
ACGIH Symposium on Cotton Dust, Atlanta, 12-13 November 1974.
- [00] Rylander R.,
Nordstrand A.,
Snella M.C. Bacterial contamination of organic dust.
Archives of Environmental Health, 1975, 30 : 137

- (101) Rylander R.,
Snella M.C. Effets pulmonaires des poussières organiques.
Sozial und Präventivmedizin, 1975, 20: 69
- (102) Rylander R.,
Snella M.C., Garcia I. Pulmonary cell response patterns after exposure to airborne bacteria.
Scandinavian Journal of Respiratory Diseases, 1975, 56 : 195
- (103) Rylander R.,
Snella M.C. Acute inhalation toxicity of cotton plant dust.
British Journal of Industrial Medicine, 1976, 33 : 175
- (104) Rylander R., Andersson K., Belin L., Berglund G., Bergström R., Hanson L., Lundholm M., Mattsby I. Studies on human exposed to airborne sewage sludge.
Schweizerische Medizinische Wochenschrift, 1977, 107 : 182
- (105) Rylander R.,
Lundholm M. Bacteria on cotton with special reference to dust inhalation effects.
Presented at the Beltwide Cotton Conference Atlanta, Georgia, USA. January 1977.
Cotton Dust Proceedings, 1977: 67-70
- (106) Rylander R.,
Snella M.C. Effect of cotton dust on free lung cells.
Proceedings of the 16th Annual Handford Biology Symposium, at Richland (Washington), 27-29 September 1976.
ERDA Symposium Series, 1977, 43: 395

- 107) Rylander R., Haglind P., Lundholm M., Mattsby I., Stenqvist K. Humidifier fever and endotoxin exposure.
Clinical Allergy, 1978, 8 : 511
- 108) Schneiter R., Neal P., Gaminata B.H. Etiology of acute illness among workers using low-grade stained cotton.
American Journal of Public Health, 1942, 32 : 1345
- 109) Schneiter R., Reinhart W.H., Caminata B.H. *Aerobacter clocae* endotoxin as a possible factor in the etiology of bagassosis.
Journal of Industrial Medicine and Toxicology, 1948, 30 : 238
- 110) Shortman K.D., Diener E., Russel P., Armstrong W.D. The role of nonlymphoid accessory cells in the immune response to different antigens.
Journal of Experimental Medicine, 1970, 131 : 461
- 111) Snell J. Effects of inhaled endotoxin.
Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 1966, 67 : 624
- 112) Snella M.C., Rylander R. Les endotoxines : un facteur négligé de l'environnement
Sozial und Präventivmedizin, 1977, 22 : 137
- 113) Snella M.C., Rylander R. Réactions cellulaires dans les poumons après inhalation de poussières de coton et d'endotoxines.
Schweizerische Medizinische Wochenschrift, 1977, 107 : 198

- (114) Snella M.C.,
Rylander R. Alteration in local and systemic
immune capacity after exposure to
bursts of CO.
*Environmental Research (to be published
1979).*
- (115) Spaepen M., Bodman H., Microorganisms in heated nebulizers.
Kundsinn R., Berryman J.,
Fencel V. *Health Laboratory and Science,*
1975, 12 : 316
- (116) Taylor A.N., Respiratory allergy to a factory
Pickering C.A.C., humidifier contaminant presenting as
Turner-Warwick M. pyrexia of undetermined origin.
British Medical Journal, 1978 : 94
- (117) Teres D., Schweers P., Sources of *P.aeruginosa* infection in
Bushnell L., Hedley- a respiratory surgical intensive
White J., Feingold D. therapy unit.
Lancet, 1973, 1 : 415
- (118) Thomas W., Holt P.G., Effect of cigarette smoking on primary
Keast D. and secondary humoral responses of
mice.
Nature, 1973, 243 : 240
- (119) Thomas W.R., Holt P.G., Humoral immune response of mice with
Keast D. long-term exposure to cigarette smoke.
Archives of Environmental Health,
1975, 30 : 78
- (120) Tomasi T.B. Secretory immunoglobulins.
New England Journal of Medicine,
1972, 287 : 500
- (121) Vesell E.S., Lang C.M., Environmental and genetic factors
White W.J., affecting the response of laboratory
Passananti G.T., animals to drugs.
Hill R.N., Clemens T.L., *Federation Proceedings, 1976, 35:1125*
Liu D.K., Johnson W.D.

- 22) Walker R., Edison G.,
Hatcher J. Influence of cotton dust inhalation
on free lung cells in rats and guinea
pigs.
Laboratory Investigation, 1975, 33 :
28
- 23) Walter C.W. "Comfortable air" may spread infection.
Modern Hospital, 1966, 107 : 103
- 24) Wanner H.U., Wirz M. Hygienische aspekte der Luftbefeuch-
tung in Klimaanlageen.
Sozial und Präventivmedizin, 1974, 19:
351
- 25) Wanner H.U. Mikrobielle verunreinigung der Luft
durch Belebtschlammbecken (Microbial
contamination of air by activated
sludge units).
*Zentralblatt fuer Bakteriologie,
Parasitenkunde, Infektionskrankheiten
und Hygiene. I. Abt. Originale .Reihe B.*
1975, 161 : 46
- 26) Watson J.A., Spritzer
A.A., Auld J.A., Pulmonary clearance by fecal and
oesophagal measurements.
Archives of Environmental Health,
1966, 13 : 586
- 27) Weiss N., Soleymani Y. Hypersensitivity lung disease caused
by contamination of an air-conditioning
system.
Annals of Allergy, 1971, 29 : 154
- 28) Zarkower A. Alteration in antibody response induced
by chronic inhalation of SO₂ and
carbon.
Archives of Environmental Health,
1972, 25 : 45

